

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Dpto. de QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS INSTRUMENTAL

**ADSORCIÓN DE CUCURBI[6]URIL
EN ELECTRODO DE MERCURIO Y
EN ORO. ESTUDIO DE LA
INTERACCIÓN CON CADMIO (II)
Y DETERMINACIÓN DE 3,5-iodo-
4-hidroxibenzonitrilo**

ELÍAS BLANCO GIL
Madrid, 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS
INSTRUMENTAL



**ADSORCIÓN DE CUCURBI[6]URIL EN ELECTRODO DE MERCURIO
Y EN ORO. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN CON CADMIO (II) Y
DETERMINACIÓN DE 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo**

Memoria que presenta el
Licenciado ELÍAS BLANCO
GIL para optar al grado de
Doctor en Ciencias (Químicas).



Facultad de Ciencias

PEDRO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, Doctor en Ciencias Químicas, Profesor Titular de Universidad en el Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid

INFORMA:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado “ADSORCIÓN DE CUCURBI[6]URIL EN ELECTRODO DE MERCURIO Y EN ORO. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN CON CADMIO (II) Y DETERMINACIÓN DE 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo”, ha sido desarrollado bajo mi dirección por D. ELÍAS BLANCO GIL en el Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid. También hace constar que el trabajo descrito en ella reúne, en su opinión, todos los requisitos para su defensa y aprobación, por lo que, como director y tutor del trabajo de investigación, autoriza su presentación para que se defienda como Tesis Doctoral.

Y para que conste firma el presente documento en Madrid, a 1 de junio de 2012.

V. B. del Departamento

Fdo. Pedro Hernández Hernández

Fdo. Jesús Rodríguez Procopio

Ciudad Universitaria de Cantoblanco. 28049 Madrid. Teléfono 497 50 00

A mi madre

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a:

Al Dr. Pedro Hernández Hernández, Director de esta Tesis, por su apoyo, confianza, dedicación y amistad.

Al Catedrático Lucas Hernández Hernández (D.E.P.), Director de esta Tesis. Me acuerdo de los quebraderos de cabeza cuando se nos escapaban los tartratos de las membranas de diálisis, de cuando nos salían estequiometrías raras con el cucur,... una pena que se nos fuese tan pronto.

A todos los profesores de la Universidad Autónoma de Madrid y en especial a los profesores del Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental. Quisiera hacer una mención especial a la Dra. María del Carmen Quintana Mani por su apoyo y ayuda. Al Dr. Fernando Galán Estella por su inestimable ayuda. A Ana, María Jesús, Mónica, Alberto, Pilar, Elena y Merche.

A mis compañeras de laboratorio María del Pozo y Dra. Carmen Sagrario Hernández Domínguez.

A la Dra. Lorena Welte, compañera de Químicas, sin cuya instrucción en el uso del AFM, parte de esta Tesis no habría sido posible. Me acuerdo de aquel agosto del 2008 cuando en 5 minutos me solucionaba la vida con el aparato. En este punto también quisiera mencionar la ayuda de Miguel Ángel Fernández Vindel del Departamento de Química Inorgánica.

A la Universidad Autónoma de Madrid, sin cuyos servicios como el Servicio Interdepartamental de Investigación, la Biblioteca, o los Servicios Generales de Apoyo a la Investigación Experimental (en especial a Nuria Díaz Contreras) esta Tesis no habría sido posible.

A The Cambridge Crystallographic Data Centre por el suministro de datos de estructuras cristalográficas.

A la Universidad Autónoma de Madrid y Comunidad Autónoma de Madrid por los proyectos CCG07-UAM/PPQ-1645, CCG07-UAM/PPQ-4439, S2009/PPQ-1642 (AVANSENS). Al Ministerio de Ciencia e Innovación por el proyecto CTQ2008-02272/PPQ. A la Comunidad Autónoma de Madrid por el contrato asociado al proyecto S2009/PPQ-1642 (AVANSENS).

A mis compañeros de la A.E.C. Manuela Malasaña, Guillermo, Luis, Juan, y especialmente a María y a Nekane. A mis compañeros de Química Mamen y en especial a Santi. A mis compañeros de Bioquímica Salvador, Nadia, Sara y en especial a Virginia. A mis compañeros del CNB, Dr. César Santiago, Dr. Juan Reguera y a Ángela. Al Dr. José María Casasnovas por dirigirme durante mi estancia en el CNB. A Abdul, Eduaj, Charo y Ali.

I

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
IV. 1. INTERACCIÓN CADMIO (II) - CUCURBIT[6]URIL MEDIANTE ELECTRODO DE GOTA ESTACIONARIA DE MERCURIO.....	57
IV. 1. 1. Influencia de la velocidad de barrido, la concentración de cadmio (II) y la concentración de cucurbit[6]uril.....	57
IV. 1. 2. Influencia de la presencia de especies competidoras.....	62
IV. 1. 2. 1. Zinc (II).....	62
IV. 1. 2. 2. Electrolito.....	68
IV. 1. 2. 2. 1. Cationes.....	68
IV. 1. 2. 2. 2. Aniones.....	71
IV. 1. 2. 2. 3. Distintas especies.....	72
IV. 1. 2. 3. Ácido acético, isobutilamina y 1,5-pentano-diamina.....	74
IV. 2. INTERACCIÓN ENTRE 3,5-iodo-4-HIDROXIBENZONITRILO Y CUCURBIT[6]URIL MEDIANTE ELECTRODO DE GOTA ESTACIONARIA DE MERCURIO.....	81
IV. 2. 1. Estudio previo.....	81
IV. 2. 2. Influencia del pH y la concentración de cucurbit[6]uril.....	82
IV. 2. 3. Influencia de la presencia de 1,5-pentanodiamina.....	87
IV. 2. 4. Influencia de la concentración de electrolito soporte.....	87
IV. 2. 5. Optimización de las condiciones instrumentales.....	88
IV. 2. 5. 1. Tiempo entre impulsos y tiempo de impulso a velocidad de barrido constante.....	88
IV. 2. 5. 2. Velocidad de barrido variando el incremento de potencial.....	89
IV. 2. 5. 3. Estudio del mecanismo de llegada del 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo.....	90
IV. 2. 5. 4. Amplitud.....	90
IV. 2. 5. 5. Potencial inicial.....	91
IV. 2. 5. 6. Tiempo de equilibrio.....	92

IV. 2. 5. 7. Tiempo de deposición.....	92
IV. 2. 6. Optimización de las condiciones instrumentales en presencia de cucurbit[6]uril.....	92
IV. 2. 6. 1. Potencial inicial.....	93
IV. 2. 6. 2. Tiempo entre impulsos y tiempo de impulso a velocidad de barrido constante.....	93
IV. 2. 6. 3. Velocidad de barrido variando el incremento de potencial.....	94
IV. 2. 6. 4. Estudio del mecanismo de llegada del 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo en presencia de cucurbit[6]uril.....	95
IV. 2. 6. 5. Amplitud.....	96
IV. 2. 7. Optimización de la concentración de cucurbit[6]uril.....	96
IV. 2. 7. 1. Concentración de cucurbit[6]uril.....	96
IV. 2. 7. 2. Tiempo de deposición y tiempo de equilibrio.....	97
IV. 2. 8. Influencia de la concentración de 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo	98
IV. 2. 8. 1. En presencia de cucurbit[6]uril.....	98
IV. 2. 9. Aplicación analítica para la detección de 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo.....	100
IV. 2. 9. 1. En presencia de cucurbit[6]uril.....	100
IV. 3. ADSORCIÓN DE CUCURBIT[6]URIL Y CUCURBIT[7]URIL EN ORO.....	101
IV. 3. 1. Adsorción a partir de disolución de cucurbit[6]uril en 0.1 M sulfato sódico.....	101
IV. 3. 2. Adsorción a partir de disolución de cucurbit[6]uril saturada.....	109
IV. 3. 3. Adsorción a partir de disolución de cucurbit[7]uril.....	113
V. CONCLUSIONES.....	119
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	125

I. INTRODUCCIÓN

I. 1. CUCURBIT[n]URILES

La familia de compuestos de los cucurbit[n]uriles son macrociclos poliméricos generados por la reacción de condensación entre glicoluril y formaldehído en condiciones ácidas. Se generan macrociclos con n unidades de glicoluril unidos por puentes metilénicos, estructura que aparece en la Figura 1. Se han usado varias abreviaturas para referirse a ellos como Qn o CCn pero en adelante se usará la más común, CB[n]. Hay excelentes revisiones de ellos [1-4] pero destacaríamos la realizada por el grupo de Isaacs [5].

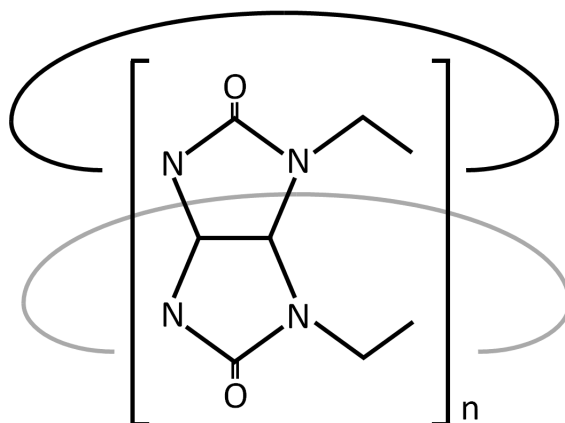


Figura 1. Representación esquemática de los CB[n].

El descubrimiento del CB[6] se produjo en 1905 por Behrend. Debido a las limitaciones técnicas de la época no se pudo elucidar su estructura pero si se sabía que formaba complejos con distintos metales y moléculas orgánicas [6]. Su estructura se determinó en 1981 por Mock y colaboradores, que le asignaron el nombre común de cucurbituril (a partir del año 2000, con el descubrimiento de sus homólogos, cucurbit[6]uril [7]) debido a su parecido con la calabaza, fruto de la planta de la familia de las cucurbitaceae, y bastante más fácil que su nombre sistemático que, de acuerdo a la nomenclatura de Chemical Abstracts, es dodecahidro-1H,4H,14H,17H-2,16:3,15-dimetano-5H,6H,7H,8H,9H,10H,11H,12H,13H,-18H,19H,20H,21H,22H,23H,24H,25H,26H-2,3,4a,5a,6a,7a,8a,9a,10a,11a,12a,13a,15,16,17a,18a,19a,20a,21a,22a,23a,24a,25a,26a-

tetracosaaazabispentaleno[1''',6'''':5'',6'',7'']cycloocta[1'',2'',3'':3',4']pentaleno(1',6':5,6,7)-cicloocta(1,2,3-gh:1',2',3'-g'h')cicloocta(1,2,3-cd:5,6,7-c'd')dipentaleno-1,4,6,8,10,12,14,17,19,21,23,25-dodecano [8].

La síntesis y el aislamiento de los homólogos del CB[6] se realizaron por el grupo de Kim en el 2000 [7] aunque posteriormente el grupo de Day estudió las condiciones químicas para su síntesis [9-10] y caracterizó el complejo entre el CB[5] y el CB[10] [11], cuyo componente más grande también se ha aislado posteriormente [12]. Las dimensiones y las estructuras cristalográficas de los CB[n] aparecen en la Tabla 1 y en la Figura 2, respectivamente. También existen otros homólogos como el CB[9] e incluso mayores que

Cucurbit[n]uril n	Peso molecular (g/mol)	Ancho de las entradas a la cavidad (nm)	Ancho en el ecuador (nm)	Altura (nm)
5	830	0.24	0.44	0.91
6	996	0.39	0.58	0.91
7	1163	0.54	0.73	0.91
8	1329	0.69	0.88	0.91
10	1661	0.90-1.10	1.07-1.26	0.91

Tabla 1. Pesos moleculares y dimensiones de los cucurbit[n]uriles [5].

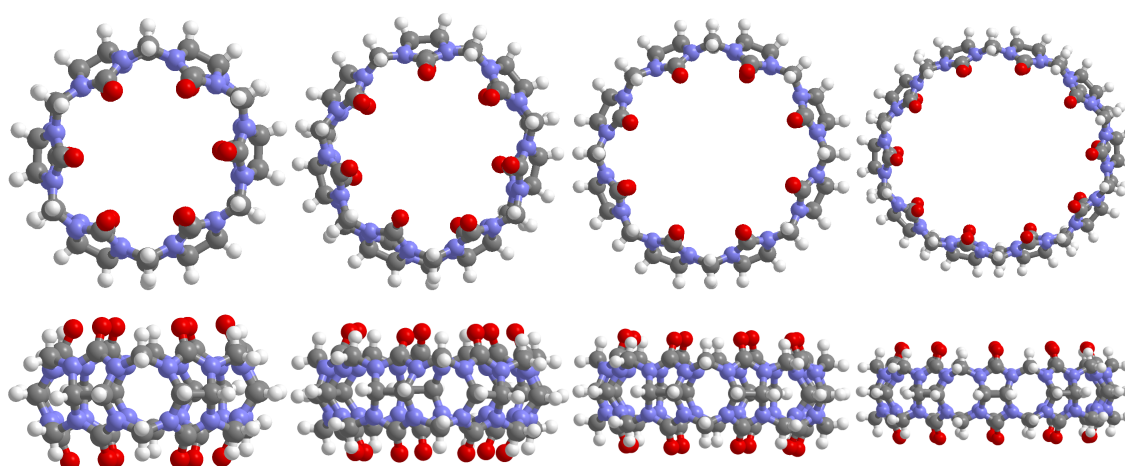


Figura 2. Vista superior y lateral de las estructuras cristalográficas del CB[6], CB[7], CB[8] y CB[10]. Se han omitido iones y moléculas de co-cristalización y los unidos a los CB[n] como sodios en el caso del CB[6] o como el CB[5] en el caso del CB[10] [7,11,31].

el CB[10], pero no se han conseguido caracterizar debido a que aparecen en las síntesis en cantidades traza [9,11]. La obtención de derivados se limitaba al decametilcucurbit[5]uril [13] y a los derivados con 5 y 6 unidades de ciclohexanoglicoluril [14] hasta que se obtuvieron a partir de las moléculas con 5, 6, 7 y 8 unidades de glicoluril sus derivados perhidroxi [15], conteniendo metilos, ciclos fusionados de 6 unidades e hidroxilos en el ecuador de los CB[n], respectivamente. Los últimos derivados son los reactivos para la formación de éteres alquílicos, ésteres y tioésteres.

El CB[6] (y homólogos) presenta diversas propiedades destacables como su alta estabilidad química puesto que no se descompone a 100 °C en ácido clorhídrico concentrado durante 24 h [9] y que también se ha puesto de manifiesto en la difícil obtención de CB[n] funcionalizados [15]. Otra es su estabilidad térmica pues no se empieza a descomponer hasta los 230 °C [16] o su rígida cavidad, aunque en ciertos casos se deforma por la inclusión [17].

El CB[6] y sus homólogos unen moléculas mediante interacciones ión-dipolo e interacciones hidrofóbicas [18-20], fuerzas que se explican a continuación. Las dos entradas a la cavidad están rodeadas de grupos carbonílicos y sus oxígenos generan una densidad de carga negativa, como se puede observar en mapas de potencial electrostático [21]. Esto hace que interaccionen favorablemente con especies cargadas positivamente, como es el caso de la unión de alquilamonios con el CB[6]. Dicha interacción favorable desaparece si el amonio se desprotona por la variación del pH, aunque el pK_a de la molécula incluida aumenta por la interacción [20,22]. El efecto hidrofóbico es debido a las interacciones de van der Waals y la desolvatación. Las primeras son débiles pero no actúan puntualmente sino en el área en la que se da la interacción, entre la superficie de la cavidad y la región alquílica de la molécula incluida. A este respecto, se ha comprobado mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear que el ambiente químico dentro de la cavidad del CB[6] es similar a la que se da en un disolvente orgánico apolar como el ciclohexano [18]. La desolvatación provoca que la entropía de la reacción de inclusión

aumente ya que parte de la molécula que se incluye pierde las moléculas de agua de solvatación al introducirse en la cavidad y la cavidad pierde 2-3 moléculas de agua [16] aunque también se han descrito iones como cloruro o sulfato dentro de la cavidad [9]. Las interacciones ión-dipolo y el efecto hidrofóbico hacen que la afinidad con 1-alkilamonios y alquildiamonios con los grupos cargados en los extremos presente la tendencia que se observa en la Figura 3. El aumento en la constante de afinidad de las moléculas con un solo grupo amonio a medida que aumenta el número de átomos de carbono es debido a que el efecto hidrofóbico aumenta. Cuando se supera el número de 4 átomos de carbono lineales la constante disminuye porque la cadena empieza a sobresalir por la otra entrada interfiriendo con la solvatación de esta. La constante de afinidad de las moléculas con dos grupos amonio aumenta al aumentar los átomos de carbono ya que los grupos amonio se encuentran más cerca de las entradas a la cavidad maximizando las interacciones ión-dipolo. Aumentos mayores en la longitud de la cadena llevan a una inadecuada disposición de ambas cargas respecto a los grupos carbonílicos y así a un descenso en la afinidad [18]. Mediante el control de las condiciones químicas, como el pH o disolvente, es posible modular estas interacciones entre los CB[n] y distintas especies.

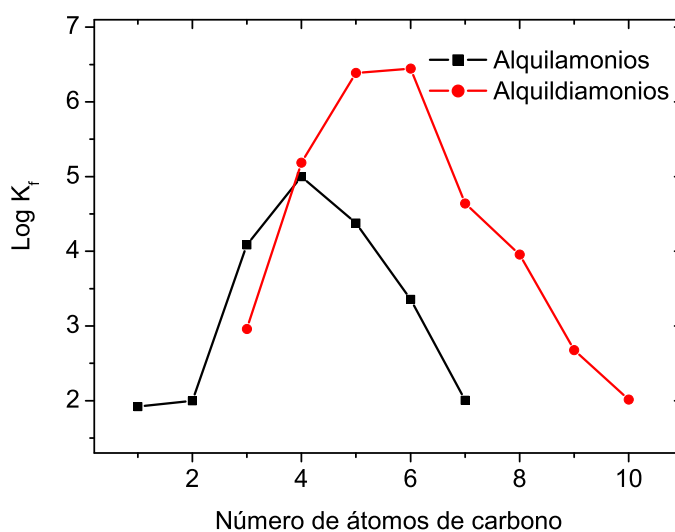


Figura 3. Constantes de afinidad entre CB[6] y 1-alkilamonios o alquildiamonios con los grupos cargados en los extremos en ácido fórmico-agua 1:1 (v/v) a 40 °C [18].

Un aspecto a destacar de la familia de los CB[n] es la evolución en el tiempo de los descubrimientos realizados. Los avances en el conocimiento de la Química de estas interacciones inicialmente tras su redescubrimiento han permitido el desarrollo de numerosas aplicaciones, lo que se pone de manifiesto en el número de publicaciones realizadas desde 1981 que incluyen estas moléculas, que aparece en la Figura 4.

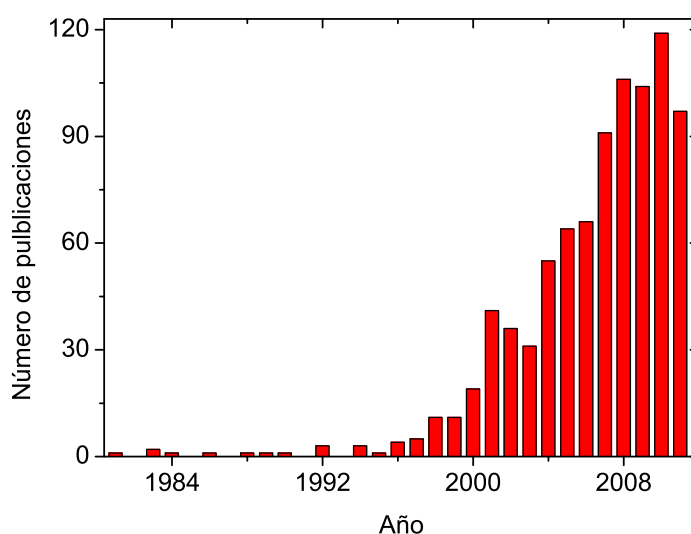


Figura 4. Histograma del número de publicaciones por año según la búsqueda realizada en la Web of Knowledge introduciendo como tema de búsqueda “cucurbituril” en octubre de 2011.

Muchos de los complejos de inclusión que se dan entre el CB[6] (y otros homólogos) son pseudorotaxanos o rotaxanos, estructuras supramoleculares que se definen a continuación pues se mencionan más adelante. Este tipo de moléculas se pueden esquematizar como la introducción de un eje (molécula incluida en la cavidad) en una rueda (cucurbit[n]uril). Se trata de un pseudorotaxano si la rueda se puede liberar y de un rotaxano si no se puede desagregar (por la adición en los extremos del eje de grupos suficientemente grandes o que generen repulsiones con la rueda), como es el caso espermina (y derivados) con el CB[6] cuya estructura cristalográfica aparece en la Figura 5 [17,23]. Hay una revisión de este tipo de agregados realizados con el CB[6] [24].

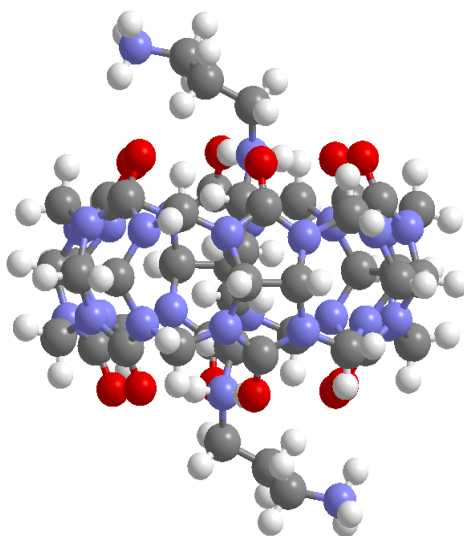


Figura 5. Estructura cristalográfica del complejo de espermina con CB[6] [23].

El inconveniente más importante del CB[6] es su baja solubilidad en agua (en torno a 20 μM) [25-28] y en disolventes orgánicos, solubilidad similar a la que presenta el CB[8]. La solubilidad de CB[5] y CB[7] en agua ya es moderada (en torno a 20-30 mM) [4]. La solubilidad del CB[6] aumenta en ácidos fuertes concentrados (método usado para su purificación por recristalización con agua [8-9]), y con ácidos débiles [29]. El aumento de solubilidad es debido a que el protón se une a una de las entradas generándose una especie cargada que es más soluble en disolventes polares ($\text{pK}_a=3.02$) [30]. La solubilidad también aumenta si hay presencia de sales de metales alcalinos o alcalino-térreos pues es de $6.6 \cdot 10^{-2}$, $9.4 \cdot 10^{-4}$, $3.7 \cdot 10^{-2}$, $5.9 \cdot 10^{-2}$, $7.0 \cdot 10^{-2}$ M en disoluciones 0.2 M sulfato sódico, cloruro de litio, cloruro potásico, cloruro de cesio, y cloruro de calcio en agua, respectivamente, también debido a que se forma un complejo cargado [31]. El grupo de Buschmann se ha basado en el aumento de solubilidad para obtener las constantes de estabilidad del CB[6] (entre otros) con diferentes iones como protones, iones de metales alcalinos, alcalino-térreos y de metales de transición, valores calculados a partir de métodos espectrofotométricos y de medida de carbono orgánico total cuyos datos se ajustaron a modelos de unión de estequiometría 1:1 entre el catión y el CB[6] [25-26,28,30,32].

En estado sólido, las estequiometrías que se obtienen son mayores debido

probablemente a la falta de disolvente lo que favorece las interacciones electrostáticas. En el campo de la cristalografía de rayos X de los complejos formados entre los CB[n] y los metales, uno de los grupos que más ha contribuido es el de Fedin. Se considera que mientras los metales alcalinos y alcalino-térreos se unen al CB[6] mediante enlaces directos catión-oxígeno carbonílico, con otros metales de mayor carga y menor radio la interacción se produce mediante los ligandos del metal, uniéndose estos al CB[6] mediante una red de enlaces de hidrógeno [33], aunque hay excepciones [34]. Se ha descrito un complejo de estequiometría 4:1 con sodio (4 sodios y 1 CB[6]) [31] y 2:1 con potasio [35], rubidio [36] y cesio [37]. Mientras que los complejos con potasio y rubidio forman estructuras poliméricas en las que los iones actúan como puente entre unidades de CB[6], con el sodio y con el cesio se dan estructuras independientes. Sin embargo, los iones no son imprescindibles para que se generen estructuras en forma de columna [38]. Las afinidades que se obtienen con distintos iones permiten la encapsulación reversible de tetrahidrofurano en el CB[6] con sodio o con cesio en disolución acuosa, proceso que a pH ácido (el protón desplaza al ión alcalino) no se da [31,37].

Mediante espectrometría de masas con ionización por electrospray, incluso habiendo un exceso de CB[6], no se consiguieron detectar especies monocatónicas, solo se observaron señales de CB[6] con dos cationes alcalinos [39]. Los estudios de complejación con distintos alcanos funcionalizados corroboraron la existencia del CB[6] como especie con un ión alcalino en cada entrada a la cavidad. Los complejos de inclusión con 1-alquilamonios de cadena corta para que no sobresaliese por la otra entrada la cadena alquílica presentan un ión alcalino en la otra entrada y la constante de afinidad disminuye al aumentar el tamaño del catión alcalino debido a un mejor ajuste entre el catión y la entrada a la cavidad (hay menos volumen disponible) pese a que la fuerza del enlace catión-oxígeno carbonílico disminuye al aumentar el tamaño. Si la molécula en estudio presenta un grupo terminal con oxígeno (alcohol o ácido carboxílico), los cationes inorgánicos hacen de puente entre el CB[6] y el oxígeno de la molécula incluida y sus constantes de unión disminuyen al aumentar el tamaño del ión al igual que con los

alquilamonios. Esto lleva a que si se usa como disolvente el ácido fórmico diluido o el tampón acético/acetato, las especies protonadas se incluyan, compitiendo con la molécula en estudio. Con alquildiamonios y estando los grupos amonio en las entradas a la cavidad, no hay cationes metálicos unidos al CB[6]. Las constantes de unión del ácido acético y de la 1,5-pentanodiamonio (cadaverina) son de 150 y $1.5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ en 0.05 M tampón cítrico/citrato pH 3.1 y 0.05 M cloruro sódico, respectivamente [40]. Se ha determinado la estructura cristalográfica en el último caso y es destacar que los grupos cargados de la molécula incluida interaccionan con los oxígenos carbonílicos de ambas entradas como se puede ver en la Figura 6 y se neutralizan así las cargas parciales negativas de los oxígenos carbonílicos [23]. Con un derivado del CB[6] soluble en agua (ciclohexanocucurbit[6]uril) se obtienen las mismas tendencias de complejación de alquilamonios y alquildiamonios (Figura 3) pero las constantes de estabilidad son 3-5 y 2-3 órdenes de magnitud superiores a las obtenidas en 50% ácido fórmico y en 0.05 M cloruro sódico, respectivamente [23]. Con el complejo de CB[6] con ciclohexilmetilamonio, a mayor concentración de sulfato sódico menor es la afinidad y la afinidad disminuye al aumentar el tamaño del ión alcalino en ácido fórmico 50% (v/v), prevaleciendo así la menor afinidad del ión alcalino al aumentar su tamaño con los oxígenos carbonílicos y no el volumen del ión, a diferencia de lo visto anteriormente [19]. Mediante técnicas computacionales, se determinó que a menor es el catión o mayor es su carga, más tiempo reside este en un oxígeno carbonílico del CB[6] [41]. El CB[6] (y derivados) no son los únicos que presentan este comportamiento ya que con CB[7] y el dicatión de metil-viológeno, a mayor es la concentración de cloruro

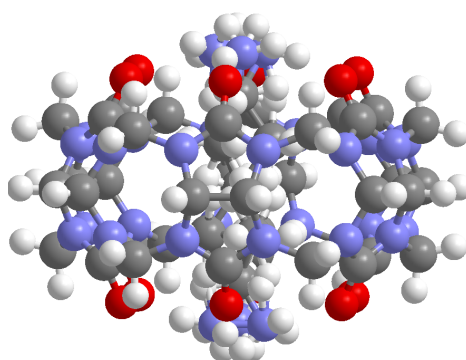


Figura 6. Estructura cristalográfica del complejo de 1,5-pentanodiamonio con CB[6] [23].

sódico, menor es la asociación, y para la misma concentración de sal, el cloruro cálcico impide más la unión que el cloruro sódico ya que se dan interacciones ión-dipolo más fuertes [42].

Con un derivado del CB[6] (junto a otros componentes) se generaron vesículas conteniendo una molécula fluorescente sensible a los protones. Al aumentar el pH y en presencia de un cloruro de metal alcalino, se produce la entrada de iones alcalinos y la salida de protones junto con el aumento en la fluorescencia. La velocidad de aumento de la fluorescencia sigue el orden $\text{Li} > \text{Cs} \sim \text{Rb} > \text{K} > \text{Na}$ [43]. Dicho orden es opuesto a la afinidad de unión del CB[6], pero con un derivado del CB[5] el orden de afinidad es $\text{Li} < \text{Na} < \text{K} > \text{Rb} > \text{Cs}$ [44].

En el mejor de nuestro conocimiento, solo se ha estudiado la interacción entre el cadmio (II) y el CB[6] o derivado mediante electrodo de gotas de mercurio (y cristalografía de rayos X) en dos casos. Con el CB[6] se obtuvo una estequiometría de 2:1 con una constante de unión de $9.95 \cdot 10^9 \text{ M}^{-2}$ [45] y con el ciclohexanocucurbit[6]uril (derivado soluble) 6:1 cuya estructura aparece en la Figura 7, con una constante de afinidad de $1.58 \cdot 10^{32} \text{ M}^{-6}$ mediante voltamperometría cíclica y de $3.06 \cdot 10^{33} \text{ M}^{-6}$ mediante voltamperometría diferencial de impulsos [34].

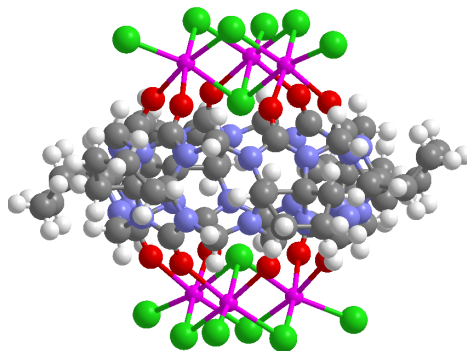


Figura 7. Estructura cristalográfica del complejo de ciclohexanocucurbit[6]uril con 6 iones de cadmio (II) [34].

Mientras que el CB[6] une moléculas con cadenas alquílicas lineales, los homólogos de mayor volumen pueden albergar derivados del benceno o estructuras bicíclicas, aunque una molécula puede incluirse en varios homólogos pero con distinta afinidad [46]. Esta afinidad diferencial hacia distintas moléculas ha permitido el diseño de un sistema de 12 componentes sintéticos en el que se da el reconocimiento molecular, “social” y en disolución acuosa, al igual que ocurre en la naturaleza [47] o la identificación mediante una lengua química de distintas aminas y amonios cuaternarios [48], en ambos casos junto a otros receptores. La afinidad de distintos receptores por una misma molécula se ha usado para la construcción de un ensamblado molecular entre el CB[6] y la β -ciclodextrina en el que el dihexilamonio actúa como “pegamento molecular” [49].

El CB[7] es capaz de incluir ferroceno, cobaltoceno y especies con la unidad de viológeno (4,4'-bipiridina), especies que se han estudiado electroquímicamente y los resultados se han revisado [50]. Con las formas oxidadas de ferroceno y cobaltoceno (ferrocenio y cobaltocenio), la constante de unión con CB[7] es mayor que sus especies neutras debido a que no solo se dan interacciones hidrofóbicas sino que hay interacciones ión-dipolo entre la molécula incluida, el ión, y los dipolos de las entradas así como con las paredes del CB[7], que están ligeramente cargadas negativamente. Su reducción ocurre sin que tengan que desencapsularse del CB[7], a diferencia de lo que ocurre con las ciclodextrinas [21,51].

Con los derivados de ferroceno con amonio se obtienen constantes de unión tan altas como 10^{12} M^{-1} . Al oxidarse el centro de ferroceno unido a amonio cuaternario, la constante de unión disminuye debido a que se da la repulsión entre cargas positivas o a que aumenta la hidrofilidad de la molécula. La oxidación del hierro en ferrocenos con un sustituyente de amonio cuaternario en cada anillo lleva a disminuciones más grandes de la constante de afinidad y la dependencia del potencial de pico anódico con la velocidad de barrido es menor que con derivados de ferroceno con sustituyentes neutros, que puede explicarse en base a que los complejos con sustituyentes de ferroceno neutros tienen más

posibilidad de reorganizarse para albergar esa carga positiva, mientras que la proximidad de las dos cargas positivas no se puede reorganizar y lleva a repulsión [21,52]. Debido a la desestabilización que se genera en estos sistemas, se obtuvieron dos complejos en los que el CB[7] pasa desde una unidad de ferroceno a una unidad hidrofóbica de xilileno o hexileno flanqueada por dos amonios cuaternarios al oxidar, proceso que es reversible volviendo a reducir. Estamos ante casos de pseudorotaxanos biestables por los dos posibles anclajes de la rueda en el eje [53]. Sin embargo, desde el punto de vista de la aplicabilidad, más importante ha sido el diseño de la molécula 1,1'-bis(trimetilamonioetil)ferroceno que presenta una constante de unión al CB[7] de $3 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1}$, similar a la del sistema avidina-biotina comúnmente usado en biomedicina. Presenta una alta eficiencia energética respecto a otros sistemas debido a que la molécula incluida es rígida a la vez que complementaria en tamaño y disposición de las cargas con el CB[7] [54]. Se ha conseguido con sistemas similares como el ferrocenilmetilamonio la inmovilización en superficie de proteínas previa adsorción del CB[7] o derivado [55-56] o la captura de proteínas de la membrana plasmática mediante modificación de estas con dicho derivado de ferroceno y posterior unión a partículas de sefarosa unidas a CB[7] [57].

La importancia de las cargas adyacentes a la unidad de ferroceno queda patente con el hecho de que el ferroceno no se une al CB[7] si tiene como sustituyente en uno de los anillos el carboxilato, cualquiera que sea el estado de oxidación del hierro. Sin embargo, se produce la unión al CB[7] tanto con cobaltoceno (cobaltoceno también y con la misma afinidad) como con los dendrímeros de ferroceno de distinta generación terminados en carboxilato, unión que es más fuerte a mayor sea el tamaño del dendrímero pues, aunque aumenta el número de grupos carboxilato (pH neutro), estos se encuentran más lejos del CB[7] unido mediante el centro de ferroceno, por lo que aumenta la constante de unión. Los mismos dendrímeros pero con cobalto (III) unen al CB[7], afinidad que disminuye si el cobalto (III) se reduce, disminución de la afinidad que es mayor a mayor sea el tamaño del dendrímero [21,58-59].

El dicatión de metil-viológeno forma un complejo 1:1 con el CB[7], afinidad que disminuye con el radical de metil-viológeno y fuertemente con la especie totalmente reducida, a diferencia de la β -ciclodextrina que no une al dicatión de metil-viológeno, une un poco a su radical y une bastante a la especie neutra de metil-viológeno [60-61]. Con diferentes dialquil-4,4'-bipiridinio se demostró la importancia de la interacción hidrofóbica entre la molécula incluida y los CB[n] puesto que mientras que con metil- y etil-viológeno el CB[7] se encuentra alojado en la unidad de viológeno, con el butil-viológeno prefiere unirse a la cadena alquílica. El propil-viológeno marca la transición puesto que el CB[7] se une a ambos tipos de unidades pero la sustitución en el carbono terminal con un grupo amina o hidroxilo conlleva la disminución de la hidrofobicidad de la cadena alquílica y así a que el CB[7] se encuentre en la unidad aromática [62]. Estos desplazamientos intramoleculares debidos a cambios en la hidrofobicidad de la molécula eje sirven de base para la construcción de dos pseudorotaxanos biestables. Los ejes eran dialquil-viológenos terminados en ácido carboxílico que, a pH ácido y con 1 equivalente de CB[7], el CB[7] se encuentra “a la vez” en las unidades alifáticas pasando por la unidad aromática, mientras que el CB[7] está en la unidad de viológeno con los carboxilatos desprotonados, siendo el sistema reversible con el pH [63]. Se ha construido otro pseudorotaxano biestable con CB[6] por cambios en el pH pero es necesario el calor para que el sistema sea reversible [64]. Trabajando con dendrímeros terminados en ácido carboxílico y con una unidad central de viológeno, tanto como ácidos carboxílicos como estando desprotonados se da la interacción del viológeno con el CB[7]. Sin embargo, si están desprotonados, disminuye la afinidad respecto a los ácidos carboxílicos debido a que el viológeno está cargado positivamente y se forman pares iónicos entre los carboxilatos y la unidad de viológeno, lo que dificulta la entrada del CB[7] [65].

El CB[8] es capaz de incluir dos moléculas iguales [7] o distintas y en este último caso la formación del complejo ternario implica en ocasiones a complejos de transferencia de carga [66], complejos de los que se ha publicado una revisión [67]. Basándose en estos complejos 1:1:1, se diseñó una molécula conteniendo una unidad de 2,6-dihidroxinaftaleno

(rica en electrones) y otra de viológeno (aceptora de electrones) unidas por un conector flexible que en presencia del CB[8] forma un complejo de transferencia de carga intramolecularmente [68]. De forma parecida, si la molécula contiene otra unidad de viológeno y estas unidades están totalmente oxidadas, se forma el complejo de transferencia de carga con la unidad de naftaleno pero si están reducidas a los radicales se da el dímero de viológenos en el interior del CB[8] [69]. La importancia de las cargas cercanas a las entradas de la cavidad se pone de manifiesto en la formación de complejos ternarios entre CB[8], el dicatión de metil-viológeno y triptófano, derivados de este o péptidos conteniéndole. Si la molécula a incluir presenta una carga positiva cercana a la unidad de aromática del triptófano (la que se incluye en la cavidad), la afinidad es mayor que si no hay carga y aún mayor que si la carga cercana es negativa [70]. Aunque el CB[8] puede albergar dos anillos aromáticos “en paralelo” en su interior, con el dicatión de metil-viológeno solo se forma el complejo 1:1 debido a la repulsión electrostática que surgiría en el complejo 2:1. Sin embargo, la reducción al radical de metil-viológeno lleva a la formación del complejo 2:1 como hemos visto también en ejemplos anteriores [71]. Basándose en esto, se diseñó una molécula con dos unidades de viológeno en sus extremos unidos por una cadena alifática de 6 carbonos. El CB[8] se une a la unidad central si los viológenos están oxidados pero si se reducen electroquímicamente a los radicales, se incluyen quedando la cadena alquílica por fuera del CB[8], proceso que es reversible y que se puede realizar fotoquímicamente [72]. La formación de dímeros de radicales de metil-viológeno mediada por el CB[8] permite también la dimerización de dendrímeros de distinta generación con una unidad central de viológeno [73]. Como el radical de metil-viológeno no forma complejos de transferencia de carga, se ha conseguido el control electroquímico de su formación sobre superficie [74]. Se han obtenido polímeros con hasta 4 unidades de CB[8] crecidos sobre oro mediante este tipo de complejos [75].

Los CB[n] se han usado en el desarrollo de nuevas nanopartículas o en añadir nuevas características a estas. Con un derivado del CB[6] se generaron nanopartículas que pueden albergar en su interior moléculas hidrofóbicas como tintes o medicamentos y cuya

superficie se puede decorar con moléculas fluorescentes o moléculas que se unen a receptores celulares específicos. Con una molécula citotóxica y con un derivado de folato en su superficie, estas nanopartículas presentaban una concentración máxima inhibitoria 15 veces inferior a la de la citotoxina sola con la línea celular HeLa, que sobreexpresa el receptor de folato [76]. La selectividad en el paso de iones alcalinos a través de la cavidad de otro derivado del CB[6] ha permitido la construcción de canales iónicos artificiales en vesículas [43].

El homólogo de mayor tamaño CB[7] es capaz de encapsular nanopartículas de oro de forma que estas presentan un menor tamaño (inferior o igual a 1 nm) al de las nanopartículas de oro generadas por métodos convencionales (superior o igual a 4 nm) [77]. Este menor tamaño lleva a que la región prohibida de energía sea inferior a la de las nanopartículas convencionales y similar a la que presentan los semiconductores. Mediante fotolisis flash con láser se detectaron electrones hidratados y nanopartículas con carga negativa y positiva. Estas últimas especies pueden ser útiles en la catálisis de diversos procesos como la oxidación de alcoholes, la oxidación de monóxido de carbono a baja temperatura y las reacciones de acoplamiento carbono-carbono [78]. También el CB[7] es capaz de modular la citotoxicidad de nanopartículas de oro funcionalizadas con la unidad 1,6-diaminohexano terminal, motivo responsable de su toxicidad y al que se une el CB[7]. Las nanopartículas permanecen en el endosoma celular si unen CB[7] pero si se retira mediante reacción competitiva con 1-adamantilamina, las nanopartículas pasan al citosol y son ya citotóxicas [79].

Se han generado partículas de sílice mesoporosa cargadas con una molécula fluorescente en sus poros, poros que se encuentran flanqueados por aminas que son las unidades a las que el CB[6] se une bloqueándolos. El CB[6] se libera de sus posiciones originales variando el pH y así se da la liberación de la molécula alojada, como se ve en la Figura 8 [80]. Si a este sistema se le añade una molécula capaz de variar su conformación debido a la excitación con luz, se obtiene un sistema lógico en el que solo se da la

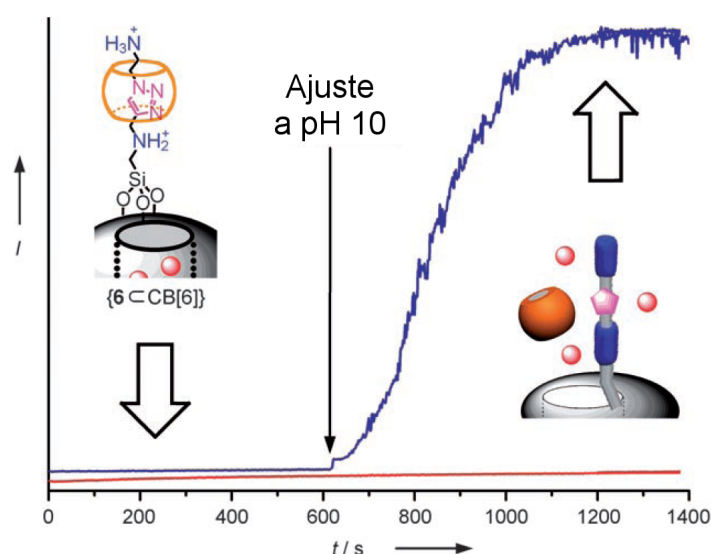


Figura 8. Fluorescencia de la rodamina B tras su liberación de los poros de nanopartículas de sílice mesoporosa por la disociación del pseudorotaxano con CB[6] que bloqueaba los poros al aumentar el pH [80].

liberación de la molécula si se da el cambio en el pH a la vez que la excitación con luz [81]. Se sintetizaron partículas coloidales de poliestireno o poli(metil-metacrilato) en presencia de 2-naftil-metacrilato que conduce a que la superficie quede decorada con naftaleno. Haciendo uso de la capacidad del CB[8] de generar complejos de transferencia de carga, se consigue por interacciones no covalentes la inmovilización selectiva de dichas partículas sobre superficies modificadas con moléculas terminadas en viológeno [82].

La inmovilización de CB[n] en superficies se ha conseguido mediante tres métodos, dos de los cuales hacen uso de superficies previamente modificadas. Uno de los métodos de inmovilización hace uso de la cavidad de los CB[n] por lo que ya no está disponible para alojar otras moléculas. Con el CB[6], las aplicaciones presentadas llevan al aislamiento de la superficie. Superficies de oro modificadas con una molécula terminada en diaminobutano se bloquean por tratamiento con CB[6] formándose los correspondientes pseudorotaxanos, proceso reversible mediante el simple tratamiento con disolución de NaOH y que lleva a que moléculas electroactivas puedan difundir hacia la superficie [83]. En superficies de nanopartículas de sílica mesoporosa se construyeron pseudorotaxanos

con CB[6] que mediante el cambio en el pH solo [80] o junto con estímulo por luz [81] se daba la liberación de la molécula incluida en los nanoporos.

También haciendo uso de la cavidad, el CB[8] forma complejos de transferencia de carga en superficies. Con los tres ejemplos mencionados a continuación, se adsorbe en la superficie una molécula que contiene una unidad de viológeno en primer lugar. Se forma el complejo de transferencia de carga si en la disolución hay una molécula rica en electrones y CB[8], complejo que se rompe si se reduce el viológeno (manteniéndose el CB[8] insertado) y se vuelve a formar si se oxida [74]. Haciendo uso de una molécula que contiene una unidad de 2-hidroxinaftaleno (se une al viológeno presente en superficie) y una unidad de viológeno (forma otro complejo ternario con otro monómero) se forman polímeros de hasta 4 unidades de CB[8] [75]. También se produce la unión si en la síntesis de partículas coloidales de poliestireno o poli(metil-metacrilato) se añade 2-naftil metacrilato, generándose partículas decoradas con naftaleno [82].

Con dos derivados de los CB[n], se ha conseguido la inmovilización del CB[6] en superficies de cristal y posterior inclusión de un derivado de una molécula fluorescente con una unidad de espermina [15] y la inmovilización del CB[7] sobre oro capaz de unir a la glucosa oxidasa modificada con ferrocenilmetilamonio, enzima que mantiene su actividad tras la modificación y adsorción [56].

La adsorción directa del CB[6] sobre cristal y en electrodos de óxido de estaño dopado con flúor se ha conseguido mediante disoluciones de CB[6] en amoníaco [84]. Sobre oro, por la simple inmersión durante 24 h de disolución acuosa 0.1 mM de CB[7] o saturada de CB[6] y CB[8], caracterizando la modificación mediante espectroscopia de absorción y reflexión con transformada de Fourier (FT-IRRAS son sus siglas en inglés), espectroscopia de electrones fotoemitidos (con abreviatura en inglés de XPS) y técnicas electroquímicas [85]. Esta última estrategia ha permitido la inmovilización de la proteína fluorescente amarilla modificada con una unidad ferrocenilmetilamonio. La

inmovilización era estable y reversible mediante el uso de (ferrocenilmetil)trimetil-amonio por presentar una mayor afinidad que el residuo de ferrocenilmetilamonio, como se muestra en la Figura 9 [55]. También mediante este procedimiento se ha medido por microscopía de fuerzas atómicas (curvas fuerza-distancia) la interacción entre la adamantina y el CB[7]. Se concluyó que había superficie de oro sin recubrir tanto mediante dichas medidas como trabajando en modo de contacto intermitente [86] también mencionado en el trabajo original [85].

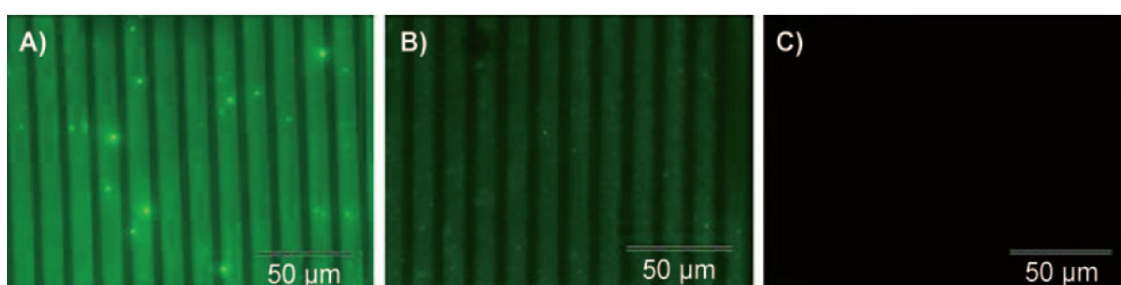


Figura 9. Imágenes de microscopía de fluorescencia de la proteína fluorescente amarilla modificada y unida a CB[7] previamente adsorbido sobre oro. A) tras la impresión por microcontacto; B) tras lavado durante 24 h en tampón fosfato; C) tras lavado durante 24 h con 5 mM (ferrocenilmetil)trimetil-amonio en tampón fosfato [55].

Los CB[n] son capaces de catalizar reacciones en su interior. Los alquinos junto con alquil-azidas sufren cicloadiciones 1,3-dipolares, que son lentas y conducen a la producción de regioisómeros de triazoles. Sin embargo, con CB[6] en cantidades catalíticas, la reacción se da regioselectivamente [87], procedimiento usado para la formación de triazoles con el CB[6] incluido en la superficie de nanopartículas de silica mesoporosa [80-81]. La encapsulación de moléculas dentro de los CB[n] promueve reacciones pero también las puede inhibir como es el caso de la cisteamina (derivado descarboxilado de la cisteína) y de su especie oxidada cistamina (dímero). Ambas especies forman complejos con el CB[6] estando incluidos en la cavidad el grupo sulfhidrilo y el grupo disulfuro, respectivamente. Estos complejos son inertes a la presencia del cloruro férrico (oxidante) y ditiotreitól (reductor), respectivamente, a diferencia de sus especies libres [88]. Con el CB[8] y mediante tratamiento con luz ultravioleta se consigue la

fotodimerización del (E)-diaminoestilbeno que sin CB[8] lleva a la fotoisomerización, a la formación del isómero Z. La fotodimerización se consigue con una alta estereoselectividad ya que la proporción syn/anti es superior a 95/5 [89]. Otro campo de síntesis en el que se han usado los CB[n] es en la generación de nanopartículas de oro. Se forman mediante adsorción en fase gas o por reducción de HAuCl_4 con NaBH_4 y presentan un diámetro pequeño (alrededor de 1 nm) ya que inmediatamente tras su formación se incluyen dentro de la cavidad del CB[7] [77]. Estas nanopartículas de oro encapsuladas dentro del CB[7] se encuentran en el límite entre los átomos individuales y las llamadas agrupaciones (clusters) y su excitación con luz visible conduce a la separación de cargas. Este fenómeno conduce a que se catalice la dimerización del fenilacetileno formándose 1,4-difenilbutadieno en presencia de dichas nanopartículas y con luz visible [78].

Existen numerosas aplicaciones de los CB[n], aparte de las anteriormente señaladas. Con el CB[6] se ha conseguido su unión al ácido desoxirribonucleico [90] o la generación de materiales porosos con capacidad igual o superior a la de las redes metal-orgánicas (MOFs son sus siglas en inglés) para adsorber acetileno [91]. Con el CB[7] la generación de hidrogeles reversiblemente [92], la ruptura de agregados J y H [93-94], la mejora de las propiedades fluorescentes por la inclusión [22] o la encapsulación de anticancerígenos mejorando sus características [95]. Se han obtenido complejos de inclusión con el CB[8] que generan nanocapas libres de hasta una molécula de espesor que hasta hace poco estaba limitado a los materiales inorgánicos como el grafeno prácticamente [96]. Nuestro grupo ha publicado varias aplicaciones en el campo de la Química Analítica [97-99].

I. 2. IOXYNIL

El 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo o ioxynil es un herbicida de contacto selectivo que se usa para el control de hierbas de hoja ancha en cultivos de cereal cuya estructura aparece en la Figura 10. Es un ácido con constante de disociación de 3.96. Su acción se produce por bloqueo del fotosistema II. Su degradación se lleva a cabo principalmente por microorganismos aunque también se degrada abióticamente generándose los derivados en los que uno o todos los ioduros se han sustituido por protones o grupos hidroxilo [100]. Su principal producto de degradación es el 3,5-diiodo-4-hidroxibenzamida, proceso realizado por hidratasa de nitrilos. Este derivado puede degradarse al producto con ácido carboxílico (ácido 3,5-diiodo-4-hidroxibenzoico) mediante una amidasa. La conversión directa del ioxynil al derivado carboxílico puede ocurrir mediante una nitrilasa. Dicho gen ha sido introducido en diversas plantas de interés comercial para generar cultivos resistentes a ioxynil y su análogo con bromo [101]. También se ha observado la degradación del ioxynil a su derivado con un solo iodo o la rotura del anillo aromático [102]. En la Unión Europea el límite máximo de un plaguicida y sus residuos es de 0.1 µg/l, y el de la suma de plaguicidas de 0.5 µg/l [103].

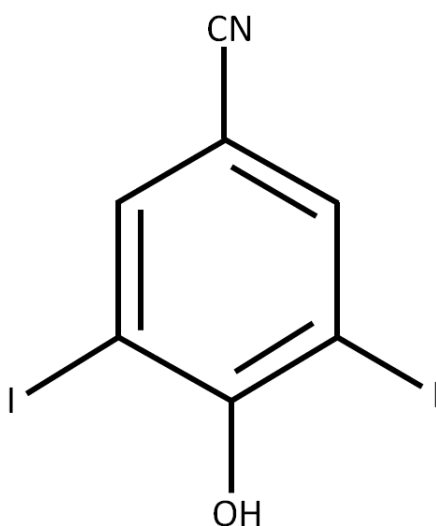


Figura 10. Estructura del 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo (ioxynil).

En su análisis se han usado tres técnicas de separación. Una es la electroforesis capilar, acoplada a detección por espectroscopia de absorción ultravioleta [104] o espectrometría de masas [105-106]. Mediante cromatografía de gases se han analizado sus derivados tras tratamiento con diazometano [107-108] o con anhídrido heptafluorobutírico [109]. Otro método es por cromatografía líquida en fase reversa con detección por espectroscopia de absorción ultravioleta [110-112].

Pocos trabajos han usado la detección electroquímica, en un caso acoplado a cromatografía líquida en fase reversa y en el que por detección electroquímica se obtenía una sensibilidad un orden de magnitud superior que con detección por espectroscopia de absorción ultravioleta [113] y en otro caso trabajando con electrodos de pasta de carbono modificados con C_{18} [114]. En nuestro conocimiento, no hay ninguna metodología analítica que haga uso del electrodo de gotas de mercurio para su determinación [115] aunque se sabe que en presencia de moléculas donadoras de protones, su reducción implica dos electrones, dos protones y la liberación de yoduro [116].

I. 3. MICROSCOPÍA DE FUERZAS ATÓMICAS

Una definición de la nanotecnología es un nuevo tipo de tecnología basada en el diseño, desarrollo y aplicación de materiales y dispositivos de tamaño nanométrico, lo que implica la manipulación de la materia a escala atómica y molecular. Es una nueva ciencia multidisciplinar que ha cambiado y está modificando la forma en la que los científicos abordan la investigación y el desarrollo de nuevos dispositivos. Una revolución que se basa en nuevos dispositivos, ideas y avances técnicos siendo fundamentales los instrumentos capaces de medir y manipular átomos y moléculas.

Normalmente, cuando se nos habla de microscopios, nos viene la imagen de un instrumento de tamaño y peso pequeños (lo suficiente para ser transportado por una persona) y que mediante uno o un par de oculares permite la magnificación de la imagen de una muestra. Esta magnificación se produce mediante la óptica del aparato. Lo que se ve en el microscopio es debido a la luz que incide en la muestra se refleja en ella y pasa a través de la óptica del instrumento. Si en vez de radiación electromagnética se trabaja con electrones, la microscopía es llamada electrónica y el microscopio ya no es fácilmente transportable ni tan barato como un simple microscopio óptico. En ambos casos, las imágenes normalmente se obtienen de un plano horizontal a la superficie y no permiten saber qué altura o profundidad tienen los elementos característicos de la superficie.

Otro tipo de microscopios son los que se encuentran englobados en la microscopía de campo cercano y se basan en la interacción física entre una punta muy fina y la muestra. El primer microscopio de este tipo fue el microscopio de efecto túnel (STM son sus siglas en inglés) inventado por Binnig y Rohrer en 1981 [117]. Si entre una muestra conductora y una punta metálica se aplica una diferencia de potencial y ambos objetos están suficientemente cerca, se genera una corriente eléctrica. A más cerca esté la punta de la muestra, más intensidad de corriente túnel. Mediante un mecanismo que hiciese que la punta se moviese en el plano paralelo a la muestra (plano x-y), un mecanismo que hiciese que la punta se acercase o se alejase de la muestra (dirección z) y un mecanismo de

retroalimentación (feed-back en inglés) para que, si la corriente aumenta, la punta se aleje y viceversa, se logra que al explorar un área de la superficie la intensidad de corriente túnel se mantenga constante. Si se representa para cada punto del plano lo que se ha alejado o acercado la punta a la superficie, se obtiene la topografía de la superficie. El principal defecto de este microscopio es que solo se puede usar con muestra que sean conductoras o semiconductoras.

Este importante defecto se superó en 1986 por Binnig y Quate con la creación del microscopio de fuerzas atómicas (abreviatura de AFM en inglés) que permitía también medir superficies no conductoras [118]. Los fundamentos de la técnica son similares a los del microscopio de efecto túnel puesto que hay una punta cercana a la muestra. Pero ahora la punta está al final de una micropalanca capaz de curvarse como un muelle. Al acercarse la micropalanca a la muestra, llegará un punto en el que ambos objetos tenderán a interaccionar. Si dicha interacción es atractiva y debido a que la micropalanca se puede curvar, la punta tenderá a acercarse más a la muestra combándose la micropalanca. Si continuamos el acercamiento, la fuerza entre la muestra y la punta será repulsiva, el microcantilever se doblará pero en sentido opuesto. Estos son los fundamentos de la parte mecánica del microscopio.

¿Cómo se detectan estos cambios? Una de las posibilidades es que el haz de un láser se dirija a la punta de la micropalanca, en la zona donde se encuentra la punta pero por el otro lado, como se muestra en la Figura 11. Dicha cara de la micropalanca está recubierta de un material que provoca la reflexión de la luz. Un fotodiodo se ajusta de forma que el haz incida en él tras reflejarse en el microcantilever. Los cambios en la flexión de la micropalanca se detectarán en el fotodiodo.

En el llamado modo contacto, se hace que la posición del haz en el fotodiodo se mantenga constante por lo que la flexión de la micropalanca es constante. Al barrer una superficie, de nuevo un sistema de retroalimentación hace que el microcantilever se aleje

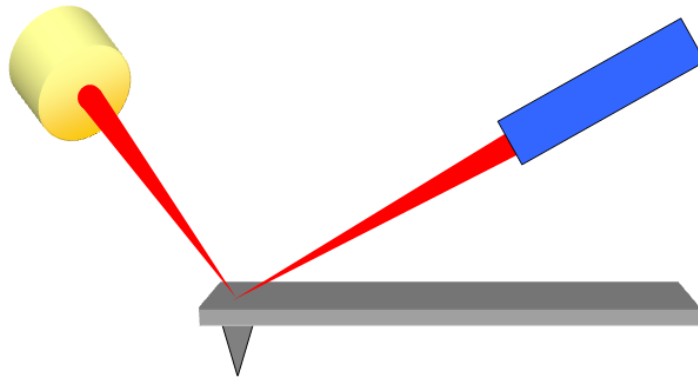


Figura 11. Micropalanca rectangular con punta y sistema de detección.

o se acerque para mantener esa flexión. Este proceso lo lleva a cabo un piezoeléctrico (controlado por la electrónica del microscopio). Estos materiales son cerámicos que debido a la aplicación de voltajes son capaces de expandirse y contraerse. Debajo de la muestra, como es el caso del equipo que se usó, otro piezoeléctrico permite que la superficie se pueda caracterizar (mediante movimientos en el plano x-y). En este modo la punta está presionando la muestra, la fuerza entre ambas es repulsiva, nos encontramos en la zona de la izquierda de la Figura 12.

Hemos explicado los componentes fundamentales de la cabeza del microscopio. El otro componente es la electrónica, el más importante pues controla el piezoeléctrico que

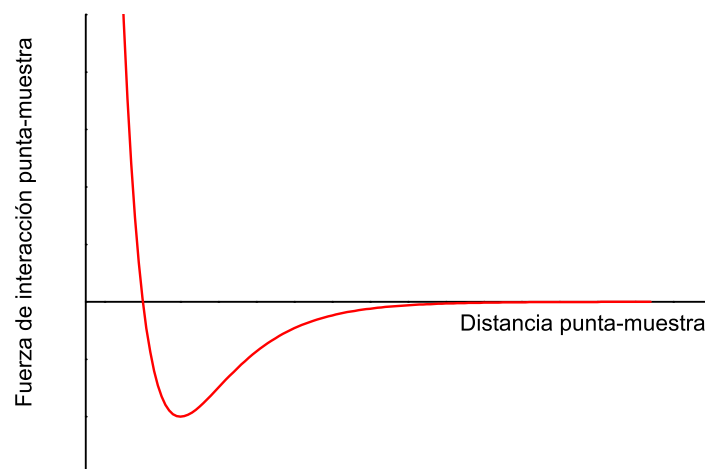


Figura 12. Fuerza de interacción punta-muestra en función de su distancia de separación en microscopia de fuerzas atómicas.

permite barrer la superficie en el plano x-y y el piezoeléctrico que hace acercarse y alejarse la punta de la muestra. Mediante la monitorización de la elongación de dicho piezoeléctrico se obtiene la topografía de la superficie. La electrónica hace que, variando la elongación del piezoeléctrico, la flexión de la micropalanca sea constante, la flexión que el usuario quiera. Hablamos del sistema de retroalimentación. Para explicarlo, pongamos el ejemplo de la conducción de un automóvil a velocidad constante (se suele poner el ejemplo de un horno). Si queremos mantener una velocidad constante en una recta sin cambios en la pendiente, es suficiente con mantener una presión constante en el acelerador. Si la pendiente aumenta, hay que hacer más presión en el acelerador, y al revés si disminuye (incluso pisar el freno). La electrónica compara el valor obtenido a través del fotodiodo con un valor de referencia o set-point. Dependiendo de la diferencia, hará que la punta se aleje o se acerque para que el sistema se encuentre lo más cercano a ese valor de referencia.

Así es como funciona el microscopio en modo contacto, la forma en que se usó este en los primeros años tras su invención. Los inconvenientes que tiene es que puede dañar la superficie debido a que la punta puede entrar en contacto lateralmente con un elemento de la superficie y la resolución que se obtiene en el plano x-y es superior a los 50 nm. Posteriormente surgió el modo dinámico. En este modo la flexión de la punta no es constante. Es mas, se hace vibrar a la micropalanca a una frecuencia cercana a su frecuencia de resonancia. En el fotodiodo no hay una señal que se ha de mantener constante, sino una oscilación del haz que si lo ha de ser. Dentro de este modo, el mecanismo de retroalimentación controla que la amplitud o la frecuencia sean constantes respecto al valor de referencia. Mientras que en modo contacto, a mayor set-point fijado, mayor fuerza se hace entre la punta y la muestra, en el caso de que se controle la amplitud en modo dinámico, un mayor set-point implica una mayor amplitud de oscilación. En la gráfica de la Figura 12 la punta se “movería” en parte de la zona de atracción y en la zona donde no se da la interacción y en este último caso la punta se encuentra lejos de la muestra, cuando su posición está desplazada 180° de su punto de máxima interacción con

la muestra dentro del ciclo sinusoidal de vibración de la micropalanca. Otra forma de medida es el modo de contacto intermitente en el que de igual forma se hace vibrar a la micropalanca pero en la zona del mínimo de fuerza de la Figura 12, modo en el que se entra en modo contacto en parte del ciclo de oscilación.

El set-point quizá sea el parámetro ajustable más importante para el buen manejo del microscopio. Aunque el propósito de la medida en modo dinámico sea la minimización de las fuerzas repulsivas entre la muestra y la punta para evitar que ambas se dañen, lo que puede implicar para la punta que presente material adsorbido, el uso de un set-point bajo lleva a la falta de definición en las medidas o a la imposibilidad de tomarlas.

La punta de la micropalanca es un componente fundamental del microscopio. Es el componente que está “en contacto” con la muestra. De su correcto estado dependerá la calidad de la información que se obtenga. Los llamados “chips”, que incluyen el sustrato donde se encuentra la micropalanca, se consideran un material fungible puesto que han de cambiarse frecuentemente. Su uso hace que la punta se desgaste, que partículas de la muestra se adhieran, e incluso pueden no presentar la calidad deseada antes de usarse. Se construyen en materiales como el silicio o el nitruro de silicio. Una de las características más importantes de la punta es su radio al final, en la parte que “contacta” con la muestra, que determinará la resolución con que las imágenes se obtengan. Rasgos de la superficie con dimensiones inferiores a ese radio aparecerán como partículas de ese radio, no podremos saber sus dimensiones x-y reales, aunque sí su altura.

Uno de los procesos que puede dañar la punta es la aproximación a la superficie. Por medio de una serie de tornillos actuados por el operador se acerca la punta a la superficie, dejando ambos a una distancia de alrededor de un milímetro. Trabajando ya con el programa que controla el microscopio, la punta se acerca a la superficie. Este es un proceso que puede durar entre 10 y 20 s y que se llega a comparar con llegar desde la Tierra a nuestro satélite en un minuto y pararse a solo 40 m de la superficie, sin estrellarnos. Este

proceso viene controlado por la electrónica del microscopio. Un motor hace que la punta se acerque y la aproximación se hace muy lenta cuando se empieza a detectar la superficie. Posteriormente, el programa nos pedirá ajustar el set-point. En este proceso, el programa, la electrónica del microscopio aumenta el set-point, la amplitud con la que la micropalanca vibra se hace mayor, la elongación media del piezoeléctrico aumenta hasta que la punta “contacta” con la superficie. Generalmente, el set-point ha de ser aumentado otra vez pero manualmente hasta que se ven los rasgos característicos de la superficie.

El otro componente es el ordenador. En este dispositivo se encuentra el programa que nos permite la adquisición de medidas mediante el control del microscopio y mostrar la topografía de las superficies. A su vez, procesar y analizar las medidas. Explicaremos a continuación qué archivos se obtienen, cómo se representan, qué filtros se aplican, etc. con el fin de obtener información estructural de los materiales estudiados. El archivo generado mediante microscopía de fuerzas atómicas (codificación aparte) es un archivo que contiene la altura de cada uno de los puntos de un área cuadrada. Cada imagen está compuesta por “x” líneas con “x” puntos por línea y a más puntos por línea la definición que se obtiene es mayor. Cada línea se habrá barrido con una frecuencia de “y” líneas por segundo (Hz). Si esta frecuencia es muy alta, se puede entrar en modo contacto porque el sistema de retroalimentación no sea lo suficientemente rápido como para alejarse de la muestra al encontrar un rasgo superficial de mayor altura que el resto de la superficie.

En la representación en dos dimensiones, se representan esos x^2 puntos. Cada punto tiene una altura, altura que en esta representación se asocia a una escala de color. De esos x^2 puntos habrá un mínimo al que se le asigna el valor de 0, y un máximo, valores de altura que se les asocia con el color negro y el blanco, respectivamente, en el caso de la escala de color que hemos usado en esta Tesis y que aparece en la parte inferior de la Figura 13. El resto de alturas intermedias se asocian con uno de los colores de la escala. Hemos de comentar también la representación en tres dimensiones, aunque no se haya usado en esta Tesis. Esta representación da una idea quizá más clara de cómo están organizadas las

estructuras, observando las partículas no desde arriba solo sino también lateralmente, y estando dichas partículas magnificadas respecto al área de la superficie barrida.

El programa que controla el microscopio es capaz de procesar las imágenes, mostrarlas, realizar análisis de la información y exportar la información obtenida. Sin procesar el archivo generado, la imagen que suele resultar generalmente es un degradado de color que coincide con la escala de color empleada, no se ve nada. Esto es debido a que según se realiza la medida, la elongación media del piezoeléctrico no suele ser constante y ha de alejarse o acercarse más a la superficie. Por ello, uno de los filtros que se suele aplicar es el llamado plano global. Consiste en generar una función que tiene las coordenadas de un plano y que minimiza las diferencias entre cada punto del plano y el punto real del archivo. El archivo filtrado consiste en las diferencias entre cada punto del plano y el punto real. Otro filtro es la ecualización. Se basa en el empleo de un histograma donde se representa la frecuencia (eje y del gráfico) con que las alturas (eje x) aparecen en el archivo. Por ejemplo, puede que la mayor parte de los puntos se encuentren en la zona central. Con la acción del operador, se hace que las alturas por debajo de esa “acumulación” de datos se hagan 0, y que las alturas por encima no se consideren. La escala de color será la misma tras aplicar dicho filtro, pero el rango de alturas que implica será más estrecho, la imagen tendrá un contraste mayor, los rasgos de la superficie que queremos destacar se verán mejor. Este filtro ha de usarse escrupulosamente pues implica la pérdida de información.

Otra función del programa es mostrar las imágenes. En este punto hablaríamos de la representación en dos y tres dimensiones, que ya han sido comentadas, y de las distintas escalas de color precargadas en el programa y que también se pueden modificar.

En cuanto al análisis de la información, únicamente expondremos una herramienta, la única usada en esta Tesis. Se trata de la herramienta perfil. Esta permite desde un punto inicial y hasta uno final, pasando por los puntos de la imagen que se deseen, observar en un gráfico la altura (eje y) frente a la distancia recorrida (eje x).

Retomemos en este punto el modo contacto. Uno de los inconvenientes que presentaba era que podía modificar la muestra debido a que desplazase material de sus posiciones originales a otras. Con la técnica del “scratching” (también llamada nanolitografía o “nano-dozing”) esto no es el inconveniente sino el objetivo. Usaremos el término de retirada física de material.

La deposición controlada de átomos o moléculas en sustratos es uno de los objetivos de la nanotecnología. Este proceso conduce a la creación de nuevos materiales que pueden ser útiles en la Química Analítica pues permiten el desarrollo de nuevos sensores. Por medio de las nuevas microscopías podemos obtener la topografía de la superficie de los nuevos materiales, saber cuál es su rugosidad, qué altura presentan las partículas de su superficie,... pero no sabemos qué espesor presenta dicha capa depositada.

La retirada de material se basa en la aplicación de una gran fuerza punta-muestra (controlado mediante el set-point) durante un tiempo determinado en modo contacto. En este proceso la punta es usada como una especie de pala que en su movimiento arrastra material hacia los lados. Uno de los problemas del uso de esta técnica es que la punta puede verse dañada o que se adsorba material a ella. Por ello, tanto la comprobación de la frecuencia de resonancia de la micropalanca como el cambio del chip han de hacerse más a menudo que si se hiciesen medidas en modo dinámico. Esta técnica ha sido empleada en nuestro grupo de investigación para demostrar que la β -ciclodextrina tiolada forma monocapas sobre oro, no se da la superposición de moléculas del modificante. Se midió la altura de las partículas de la monocapa mixta β -ciclodextrina tiolada/pentanotiol siendo de 1.2 nm y con esta técnica se confirmó que debajo de las partículas no había más capas de la modificación, como se puede observar en la Figura 13. Se puede observar como hay una zona de 200 nm que no presenta partículas, esa zona es el sustrato, y en los laterales hay acumulación de material, que originalmente estaba en la zona en la que se aplicó la técnica. Haciendo perfiles se pudo conocer la altura de la capa, en este caso, monocapa [119].

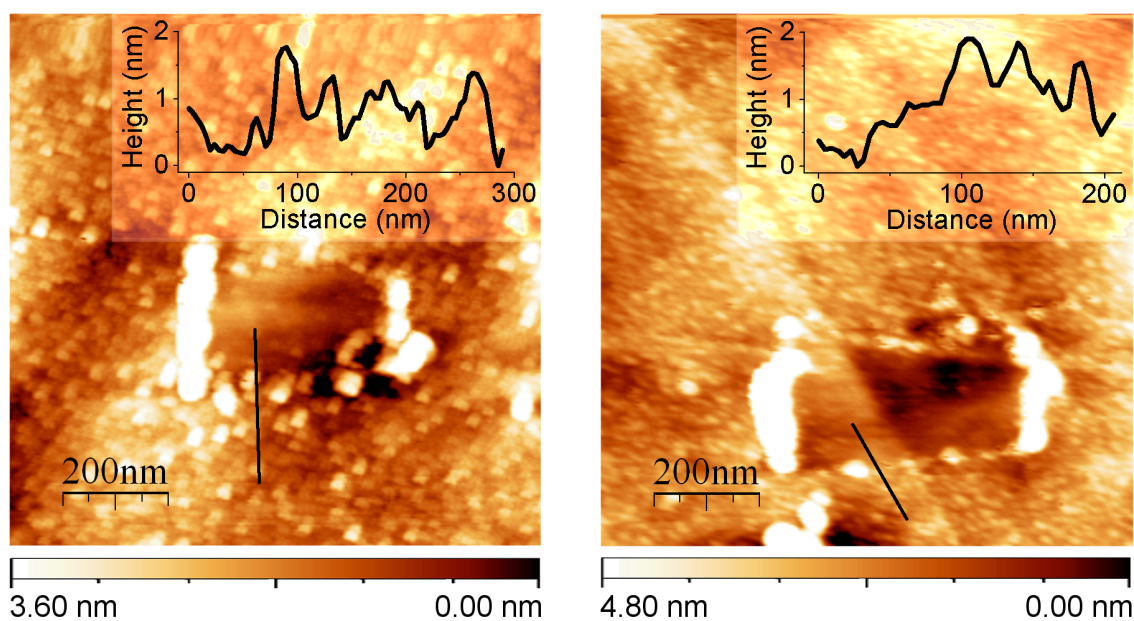


Figura 13. Imágenes de la monocapa de β -ciclodextrina tiolada (izquierda) y de la monocapa mixta beta-ciclodextrina tiolada/pentanotiol (derecha) sobre oro tras retirar material del sustrato mediante la técnica de retirada física de material [119].

Para la elaboración de esta introducción a la microscopía de fuerzas atómicas se han usado dos referencias bibliográficas [120-121].

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

II. 1. OBJETIVOS

Los objetivos del trabajo realizado fueron tres:

1) Determinación de constantes de formación y estequiometrías de reacciones de complejación ión metálico-CB[6] mediante el uso de técnicas electroquímicas usando como electrodo de trabajo el de gotas de mercurio, electrodo que se ha mostrado útil para dichos fines.

2) Elaborar un método electroanalítico para la determinación de 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo (ioxynil) mediante reducción en el electrodo de gotas de mercurio tanto en ausencia como en presencia de CB[6].

3) Estudio de la adsorción del CB[6] y el CB[7] en superficies de oro.

II. 2. PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo fue el siguiente:

1) Estudio electroquímico de la reducción de cadmio (II), el zinc (II) y el 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo (ioxynil) en presencia de CB[6] en disolución mediante electrodo de gota estacionaria de mercurio, además de sustancias competidoras en las interacciones que se establecen entre dichas especies y el CB[6] para establecer el mecanismo de interacción.

2) Estudio electroquímico de la reducción de ioxynil sin y con CB[6] y optimización de un método para la determinación de ioxynil mediante voltamperometría diferencial de impulsos.

3) Estudio de la adsorción de CB[6] y CB[7] en sustratos de oro mediante microscopía de fuerzas atómicas y en electrodos de oro mediante técnicas electroquímicas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. 1. REACTIVOS Y APARATOS

III. 1. 1. Reactivos

$\text{CdSO}_4 \cdot 8/3 \text{H}_2\text{O}$ 98-103%, $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 99%, hidroquinona 99%, $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 96%, HCl 35%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 98%, NaOH 97%, NaCl 99.5%, KCl 99.5%, MeOH 99.5% de Panreac.

Ácido acético glacial 99.8%, H_3PO_4 85%, H_2O_2 30%, mercurio metal 99.99% de Scharlau.

3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo (ioxynil) 99.8% de Fluka.

$\text{NaAcO} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ 100.7% de Fischer Scientific Company.

Formaldehído 40%, $\text{Cd}(\text{AcO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 99%, H_3BO_3 99.8% de Carlo Erba.

Glicoluril, LiCl 99%, $\text{CB}[7]$ 100% de Sigma-Aldrich.

1,5-diaminopentano 98%, iso-butilamina de Acros Organics.

Nitrógeno 99.99% de Carburos Metálicos.

Ácido etiléndiaminotetraacético de Leco.

Sustratos de oro de Arrandee.

Chips para microscopía de fuerzas atómicas ORC8-PS-W de Olympus.

Butano de Repsol.

Agua ultrapura de calidad Milli-RO-Milli-Q de Waters.

III. 1. 2. Aparatos

Las medidas electroquímicas se obtuvieron mediante un potenciostato Autolab PGSTAT 302N o un μ Autolab III, ambos de Ecochemie, en ambos casos controlados por el programa GPES. En el caso de las medidas usando como electrodo de trabajo el de gotas de mercurio, se usó el primer potenciostato acoplado a 663 VA Stand de Metrohm (Figura 14) y se usaba como contraelectrodo un cilindro de carbono vítreo. Si se trabajaba con un electrodo de oro, este fue suministrado por Bioanalytical Systems y se usaba como contraelectrodo un alambre de platino. En ambos casos, el electrodo de referencia era Ag/AgCl/3 M KCl y la escala de potencial de todos los voltamperogramas presentados se encuentra referenciada respecto al potencial de este electrodo.



Figura 14. Fotografía del potenciostato Autolab PGSTAT 302N acoplado a 663 VA Stand.

El microscopio de fuerzas atómicas empleado fue un Dulcinea de Nanotec Electrónica S. L., cuya fotografía aparece en la Figura 15. El control del microscopio y los ajustes de los archivos generados se hicieron mediante el programa WSxM de la misma compañía.

El análisis elemental del CB[6] sintetizado se realizó en nuestro laboratorio con un TruSpec CHN de Leco. Para descartar la presencia de otros homólogos se usó la espectrometría de masas mediante electrospray con un equipo QSTAR de Applied

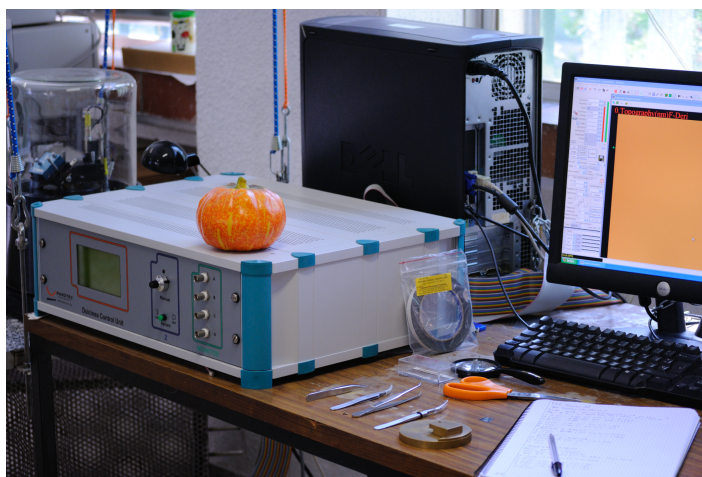


Figura 15. Fotografía del microscopio de fuerzas atómicas Dulcinea.

Biosystems en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la Universidad Autónoma de Madrid. La medida del pH se realizó mediante el equipo 827 pH lab de Metrohm. El baño de ultrasonidos era un Ultrasons de JP Selecta.

III. 2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL CUCURBIT[6]URIL

Se añadió glicoluril (34 g) a 200 ml de ácido sulfúrico concentrado, disolviéndose completamente con la ayuda de un baño de ultrasonidos, mezcla a la que se añadieron 37.5 ml de formaldehído. La mezcla se calentó a reflujo a 92-103 °C durante 10 h. Tras enfriarse, se vertió lentamente en 680 ml de MeOH formándose un sólido blanco. El sólido se filtró y se disolvió con un exceso de ácido clorhídrico generándose una disolución incolora. Se añadió muy lentamente agua y se produjeron cristales incoloros. De nuevo, se añadió ácido clorhídrico en exceso y se añadía agua [9]. Este proceso se realizó un total de 5 veces. Tras pulverizar el sólido, este se secó a 105 °C durante una noche para evaporar el agua débilmente unida al CB[6], sin que este se descompusiese [16].

La pureza del CB[6] sintetizado se determinó mediante análisis elemental. El instrumento se calibró con 10 pesadas de ácido etilendiaminotetraacético secado previamente durante 2 h a 120 °C. Se analizaron 10 muestras del sólido generando los valores de C 41.23%, H 4.00%, N 32.31%. Los valores teóricos del CB[6] con dos

moléculas de agua cristalizadas son de C 41.86%, H 3.90%, N 32.55% y con tres de C 41.15%, H 4.02%, N 31.99%. Por lo tanto, el CB[6] cristalizó con 2-3 moléculas de agua fuertemente unidas, lo que coincide con lo reportado [16].

Aunque el análisis elemental se emplea a menudo para la caracterización de CB[6], esta técnica no permite discernir qué molécula se sintetizó debido a la naturaleza polimérica de las moléculas de la familia de los CB[n]. Para confirmar la ausencia de otros homólogos se usó la espectrometría de masas mediante electrospray en modo positivo. La muestra se disolvió con disolución de ioduro de cesio y se diluyó con metanol/agua [9]. Como podemos observar en la Figura 16, el pico de mayor intensidad corresponde a la especie $[\text{CB}[6] + \text{Cs}]^+$ según los cálculos mostrados en la Tabla 2. Con menor intensidad aparece el pico del catión $[\text{CB}[6] + 2 \text{ Cs} + \text{I}]^+$ y con bastante menor intensidad el de la especie $[\text{CB}[6] + 2 \text{ Cs}]^{2+}$. También aparece el pico debido a la especie $[\text{CB}[6] + \text{Na}]^+$ lo que indica que había sodio como impureza (ver Tabla 3). Aparecen señales

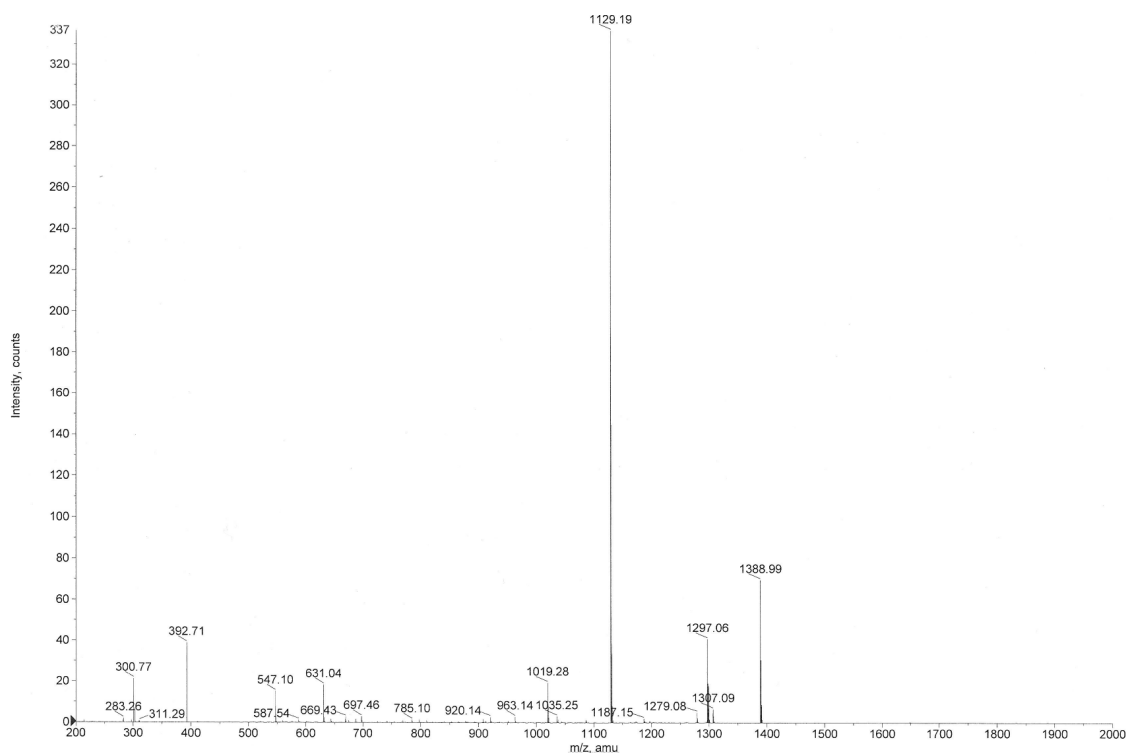


Figura 16. Espectro de masas obtenido mediante electrospray en modo positivo del CB[6] sintetizado tras su disolución con disolución de CsI.

n	Peso molecular CB[n] (g/mol)	Especie medida		
		$[\text{CB}[n] + \text{Cs}]^+$	$[\text{CB}[n] + 2 \text{ Cs} + \text{I}]^+$	$[\text{CB}[n] + 2 \text{ Cs}]^{2+}$
		Relación m/z (g/mol)		
		$\text{CB}[n] + 132.9$	$\text{CB}[n] + 392.7$	$(\text{CB}[n] + 265.8) / 2$
5	830.7	963.6	1223.4	548.3
6	996.8	1129.7	1389.5	631.3
7	1163	1295.9	1555.7	714.4
8	1329.1	1462.0	1721.8	797.5

Tabla 2. Relaciones m/z de especies de CB[n] con ión cesio tras su disolución con yoduro de cesio potencialmente detectables mediante espectroscopia de masas de electrospray en modo positivo.

n	Peso molecular CB[n] (g/mol)	Especie medida		
		$[\text{CB}[n] + \text{Na}]^+$	$[\text{CB}[n] + 2 \text{ Na} + \text{I}]^+$	$[\text{CB}[n] + 2 \text{ Na}]^{2+}$
		Relación m/z (g/mol)		
		$\text{CB}[n] + 23.0$	$\text{CB}[n] + 172.9$	$(\text{CB}[n] + 46.0) / 2$
5	830.7	853.7	1003.6	438.3
6	996.8	1019.8	1169.7	521.4
7	1163	1186	1335.9	604.5
8	1329.1	1352.1	1502.0	687.5

Tabla 3. Relaciones m/z de especies de CB[n] con ión sodio potencialmente detectables mediante espectroscopia de masas de electrospray en modo positivo.

correspondientes a las especies $[\text{CB}[7] + \text{Cs}]^+$ y $[\text{CB}[5] + \text{Cs}]^+$ (este último muy pequeño) pero se descarta la presencia de los homólogos en el CB[6] obtenido porque:

1) La síntesis se realizó en condiciones en las que se obtienen trazas de los homólogos más grandes que el CB[6] y pequeñas cantidades de CB[5], en comparación con el CB[6] [9].

2) Tanto el CB[5] como el CB[7] presentan una moderada solubilidad en agua a diferencia del CB[6] [4,25-28], por lo que quedarían en las aguas ácidas descartadas durante la purificación.

3) Considerando la relación de intensidades entre el pico de la especie $[\text{CB}[6] + \text{Cs}]^+$ y el pico de la especie $[\text{CB}[6] + 2 \text{Cs} + \text{I}]^+$, el pico de la especie $[\text{CB}[7] + 2 \text{Cs} + \text{I}]^+$ debería haberse detectado, lo cual no ocurrió.

III. 3. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES DE CUCURBIT[6]URIL Y CUCURBIT[7]URIL

Se trabajó con disoluciones de CB[6] en 0.1 M sulfato sódico de concentración conocida en torno a 2.9 mM, lo que implicaba un exceso de la sal en la disolución disolvente de CB[6]. En el caso de los estudios usando como electrolitos los cloruros de litio, sodio y potasio, a concentración 0.1 M, se prepararon disoluciones de CB[6] en disoluciones 0.1-0.2 M de estas sales a concentración de CB[6] de 2.01-2.17 mM. Fue necesario añadir un pequeño exceso de cloruro de sodio (en torno a 0.02 M) para conseguir la concentración de CB[6] deseada cuando se preparó su disolución empleando disolución de cloruro de litio.

Se usaron distintas disoluciones de CB[n] para el estudio de su adsorción en sustratos de oro mediante microscopía de fuerzas atómicas: la disolución de CB[6] en 0.1 M sulfato sódico y dos disoluciones de CB[6] y CB[7] en agua. Con el CB[6] se preparó una disolución saturada y el CB[7] se disolvió a concentración 1.02 mM. La disolución saturada se obtuvo tomando una pequeña cantidad de CB[6] en un tubo de ensayo y añadiendo agua, mezcla que se trató con el baño de ultrasonidos durante unos 30 minutos,

lo que provocó que se generase una suspensión caliente. Se dejó en reposo y al día siguiente se volvió a tratar con el baño de ultrasonidos otros 30 minutos. Pasados 4 días, se tomó disolución sin arrastrar el sólido existente en las paredes del tubo de ensayo. La modificación de electrodos de oro con CB[6] se realizó con su disolución en 0.1 M sulfato sódico.

III. 4. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PARA MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS

Los dos compuestos usados como fuente de cadmio (II) se disolvían en agua a concentración conocida, en torno a 0.01 M. La concentración de Cd (II) se mantuvo en todas las medidas constante, en el rango 79.2-80.0 μM , excepto donde se indica. Igualmente, la sal del zinc (II) usada se disolvió en agua a concentración conocida, en torno a 0.01 M. Sus concentraciones en las disoluciones medidas iban desde 79.6 a 240 μM .

Para estudiar el efecto de moléculas que forman complejos de inclusión con el CB[6] se trabajó con ácido acético, 1,5-diaminopentano e isobutilamina. El primero se diluyó en agua a una concentración conocida en torno a 0.9 M. Las aminas se diluyeron en 0.1 M HCl o tampón acético/acetato 0.01 M pH 4.2 para generar disoluciones madre 0.02 M que posteriormente se diluyeron con el mismo disolvente para generar disoluciones de concentración conocida en torno a 5 mM.

Las disoluciones madre de 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo (ioxynil) presentaban una concentración de 2.8 mM en MeOH, excepto en el caso de la reoptimización de la concentración de CB[6] y del tiempo de deposición para bajas concentraciones de analito, tanto con CB[6] como sin este, en la que se usó una disolución 0.15 mM. Partiendo de estas últimas disoluciones madre, se hicieron nuevas disoluciones mediante dilución para la calibración del método electroquímico de detección de ioxynil.

La concentración de ioxynil en las disoluciones medidas era de 10.0-10.1 μM ,

excepto en los casos indicados. En el estudio del efecto del pH sobre la reducción del ioxynil, se trabajó a dos concentraciones de CB[6], 10.2 y 20.2 μM , y se varió el pH de los electrolitos a concentración 0.01 M entre 2.3 y 9.2.

La optimización de la concentración de electrolito tampón fosfato sódico pH 6.1 se realizó con las siguientes concentraciones: 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 M. En presencia de CB[6] a concentración 20.2 μM , se emplearon las mismas concentraciones pero el electrolito era tampón acético/acetato pH 4.2. En ausencia de CB[6], tras optimizar la concentración de electrolito y las variables instrumentales, se optimizó el tiempo de deposición a una concentración de analito de 5.85 nM (2.17 ng/ml). Tras optimizar las variables químicas e instrumentales para la determinación de ioxynil en presencia de CB[6], se reoptimizó la concentración de CB[6] para una concentración de ioxynil de 0.398 μM (148 ng/ml). La optimización del tiempo de deposición se realizó a concentración constante de ioxynil de 0.149 μM (55.1 ng/ml) y de CB[6] de 99.9 μM . La dependencia entre la señal electroquímica del ioxynil y la concentración de analito en presencia de CB[6] se realizó a concentración constante de CB[6] de 101 μM . Esta concentración de CB[6] también se mantuvo en la determinación de ioxynil en muestras de agua potable dopada con el analito.

La aplicación de la metodología para la detección de ioxynil en agua potable se realizó dopando esta con ioxynil a una concentración de 220 ng/ml.

La hidroquinona se disolvió en 0.1 M ácido sulfúrico a concentración conocida, en torno a 0.1 M. Las medidas electroquímicas empleando un electrodo de oro se realizaron a concentración constante de hidroquinona 1.04 mM en 0.1 M ácido sulfúrico.

III. 5. MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS

Las medidas se realizaron justo a continuación de preparar las disoluciones, excepto donde indicado.

III. 5. 1. Electrodo de gotas de mercurio

Tras la preparación de las disoluciones de medida se hacía pasar una corriente de nitrógeno a través de la disolución en la celda de medida durante 10 minutos para retirar el oxígeno en disolución.

III. 5. 1. 1. Medidas con cadmio (II) y zinc (II)

Se empleó voltamperometría cíclica a una velocidad de barrido de 100 mV/s excepto donde se indica. Únicamente se usó la voltamperometría diferencial de impulsos en el estudio de la cinética de interacción entre el Cd (II) y el Zn (II) con el CB[6] aplicando las siguientes condiciones: tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, potencial inicial, incremento de potencial, velocidad de barrido y amplitud de, respectivamente, 0 s, 5 s, 0.05 s, 0.3 s, -0.1 V, 6 mV, 20 mV/s y 50 mV.

III. 5. 1. 2. Medidas con 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo

La comprobación de la irreversibilidad electroquímica del 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo (ioxynil) se realizó mediante voltamperometría cíclica a 100 mV/s (ver IV. 2. 1). La obtención del número de electrones de la reducción electroquímica del ioxynil se estudió comparando el potencial de semionda obtenido mediante barrido lineal de potencial con goteo del electrodo y el potencial de pico obtenido mediante voltamperometría diferencial de impulsos con electrodo de gota estacionaria. Con la primera técnica, el tiempo de goteo y el incremento de potencial fueron de 0.5 s y de 9 mV, respectivamente. Con voltamperometría diferencial de impulsos, el tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, potencial inicial, incremento de potencial, velocidad de barrido y amplitud fueron de, respectivamente, 15 s, 10 s, 0.04 s, 0.5 s, -0.2 V, 9 mV, 18 mV/s y 80 mV.

En el estudio del pH con el ioxynil se emplearon las siguientes condiciones: tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, incremento

de potencial, velocidad de barrido y amplitud de, respectivamente, 0 s, 5 s, 0.05 s, 0.3 s, 4.05 mV, 13.5 mV/s y 50 mV. A los dos pH más ácidos estudiados, el potencial inicial era de -0.1 V, para el más alcalino de -0.3 V y para el resto -0.2 V. El estudio del efecto de la concentración de CB[6] en 0.01 M tampón fosfato pH 6.1, la optimización de la concentración de CB[6] en 0.01 M tampón acético/acetato pH 4.2, las optimizaciones de la concentración de electrolito en ausencia de CB[6] (tampón fosfato pH 6.1) y con CB[6] (tampón acético/acetato pH 4.2) se realizaron en las condiciones anteriormente mencionadas con potencial inicial de -0.2 V.

III. 5. 1. 2. 1. Optimización de las condiciones instrumentales

Expondremos a continuación las condiciones instrumentales utilizadas para la optimización de estas y cuyos resultados se exponen en la sección IV. 2. 5. Partiendo de las condiciones usadas en la optimización de las condiciones químicas, se modificaba una variable manteniendo el resto constantes. Una vez que dicha variable se había optimizado, el nuevo valor se mantenía constante en las siguientes optimizaciones y así sucesivamente.

Se comenzó con el potencial inicial que se varió entre -0.1 y -0.4 V, con tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, incremento de potencial, velocidad de barrido y amplitud de, respectivamente, 0 s, 5 s, 0.05 s, 0.3 s, 4.05 mV, 13.5 mV/s y 50 mV. Posteriormente, se estudió el tiempo de deposición variándolo entre 0 y 60 s, con tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, potencial inicial, incremento de potencial, velocidad de barrido y amplitud de, respectivamente, 5 s, 0.05 s, 0.3 s, -0.1 V, 4.05 mV, 13.5 mV/s y 50 mV. Luego se estudió el tiempo entre impulsos y el tiempo de impulso (ver IV. 2. 5. 1), manteniendo constantes el tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, potencial inicial, velocidad de barrido y amplitud en, respectivamente, 10 s, 5 s, -0.1 V, 13.5 mV/s y 50 mV; se estudiaron los tiempos entre impulsos de 0.5, 0.4, 0.3 y 0.2 s con los valores de incremento de potencial de, respectivamente, 6.75, 5.4, 4.05 y 2.7 mV para mantener dicha velocidad de barrido; para cada tiempo entre impulsos, se probaron varios tiempos de impulso, de 0.02 a 0.125

s. Después se varió la velocidad de barrido (ver IV. 2. 5. 2) entre 3.9 y 24 mV/s mediante cambios en el incremento de potencial entre 1.95 y 12 mV, respectivamente, manteniendo el tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, potencial inicial y amplitud en 10 s, 5 s, 0.04 s, 0.5 s, -0.1 V y 50 mV, respectivamente. Para estudiar el mecanismo de llegada del ioxynil al electrodo, junto con los datos obtenidos de variación del potencial de pico del ioxynil respecto a la velocidad de barrido mediante el cambio en el incremento de potencial, se estudió dicha dependencia pero con el cambio del tiempo entre impulsos, variándolo de 0.2 a 0.5 s. Se mantuvieron constantes el tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, potencial inicial, incremento de potencial y amplitud en 10 s, 5 s, 0.04 s, -0.1 V, 3 mV y 50 mV, respectivamente (ver IV. 2. 5. 3). Luego se estudió la amplitud (ver IV. 2. 5. 4) variándola entre 10 y 120 mV y manteniendo constantes el tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, potencial inicial, incremento de potencial y velocidad de barrido en, respectivamente, 10 s, 5 s, 0.04 s, 0.5 s, -0.1 V, 9 mV y 18 mV/s. Aunque ya se había estudiado, se procedió a repetir el estudio del potencial inicial con las nuevas condiciones instrumentales optimizadas (ver IV. 2. 5. 5) entre -0.1 y -0.5 V con tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, incremento de potencial, velocidad de barrido y amplitud de, respectivamente, 10 s, 5 s, 0.04 s, 0.5 s, 9 mV, 18 mV/s y 80 mV. Después, el tiempo de equilibrio (ver IV. 2. 5. 6) entre 5 y 15 s, siendo constantes el tiempo de deposición, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, incremento de potencial, velocidad de barrido y amplitud en, respectivamente, 10 s, 0.04 s, 0.5 s, -0.2 V, 9 mV, 18 mV/s y 80 mV. Por último, se volvió a estudiar el tiempo de deposición entre 0 y 30 s, manteniendo el tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, potencial inicial, incremento de potencial, velocidad de barrido y amplitud con los valores constantes de 10 s, 0.04 s, 0.5 s, -0.2 V, 9 mV, 18 mV/s y 80 mV, respectivamente, pero la señal se saturaba. Trabajando con una concentración de ioxynil en la celda de medida mucho menor se volvió a optimizar el tiempo de deposición (ver IV. 2. 5. 7) entre 0 y 300 s manteniendo las variables de tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, potencial inicial, incremento de

potencial, velocidad de barrido y amplitud de, respectivamente, 10 s, 0.04 s, 0.5 s, -0.2 V, 9 mV, 18 mV/s y 80 mV.

Las medidas realizadas para la calibración del método así como con la muestra para la aplicación analítica se realizaron con las siguientes condiciones instrumentales: tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, potencial inicial, incremento de potencial, velocidad de barrido y amplitud de 300 s, 10 s, 0.04 s, 0.5 s, -0.2 V, 9 mV, 18 mV/s y 80 mV, respectivamente.

III. 5. 1. 2. 2. Optimización de las condiciones instrumentales en presencia de cucurbit[6]uril

Al igual que en la optimización de las variables instrumentales realizada en ausencia de CB[6], a continuación se presentan los valores de estas condiciones cuyos resultados se exponen en la sección IV. 2. 6.

En primer lugar, se optimizó el potencial inicial (ver IV. 2. 6. 1), variándolo entre -0.1 y -0.35 V, manteniendo el tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, incremento de potencial, velocidad de barrido y amplitud en 0 s, 5 s, 0.05 s, 0.3 s, 4.05 mV, 13.5 mV/s y 50 mV, respectivamente. Después se optimizó el tiempo de deposición variándolo entre 0 y 30 s, con el resto de condiciones instrumentales fijas: tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, potencial inicial, incremento de potencial, velocidad de barrido y amplitud de, respectivamente, 5 s, 0.05 s, 0.3 s, -0.1 V, 4.05 mV, 13.5 mV/s y 50 mV. A continuación, se estudiaron el tiempo entre impulsos y el tiempo de impulso a velocidad de barrido constante (ver IV. 2. 6. 2), lo que implicaba variar el incremento de potencial si se variaba el tiempo entre impulsos. Se estudiaron los tiempos entre impulsos de 0.5, 0.4 y 0.3 s, con incrementos de potencial de 6.75, 5.4 y 4.05 mV, resultando una velocidad de barrido constante de 13.5 mV/s. Para cada tiempo entre impulsos se estudiaron tiempos de impulso de 0.02 a 0.07 s. El resto de variables instrumentales se mantuvieron fijas y fueron tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, potencial inicial y amplitud, con valores de,

respectivamente, 5 s, 5 s, -0.1 V y 50 mV. Trabajando con el tiempo entre impulsos óptimo, se optimizó la velocidad de barrido cambiando el incremento de potencial (ver IV. 2. 6. 3) entre 1.95 y 12 mV, obteniéndose velocidades de barrido de 3.9 a 24 mV/s. En este caso, el resto de condiciones instrumentales fueron tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, potencial inicial y amplitud eran de, respectivamente, 5 s, 5 s, 0.04 s, 0.5 s, -0.1 V y 50 mV. Junto con los datos obtenidos de variación del potencial de pico del ioxynil respecto a la velocidad de barrido mediante el cambio en el incremento de potencial en presencia de CB[6], se estudió dicha dependencia pero con el cambio del tiempo entre impulsos para estudiar el mecanismo de llegada del ioxynil al electrodo (ver IV. 2. 6. 4). Se varió entre 0.5 y 0.2 s a incremento de potencial fijo de 3 mV, obteniéndose velocidades de barrido entre 6 y 15 mV/s, con el resto de variables constantes: tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, potencial inicial y amplitud de, respectivamente, 5 s, 5 s, 0.04 s, -0.1 V y 50 mV. Por último se optimizó la amplitud (ver IV. 2. 6. 5) que se varió entre 10 y 100 mV, a tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, potencial inicial, incremento de potencial y velocidad de barrido constantes de, respectivamente, 5 s, 5 s, 0.04 s, 0.5 s, -0.1 V, 9 mV y 18 mV/s.

Con las nuevas condiciones instrumentales de tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, potencial inicial, incremento de potencial, velocidad de barrido y amplitud de, respectivamente, 5 s, 5 s, 0.04 s, 0.5 s, -0.1 V, 9 mV, 18 mV/s y 80 mV, se volvió a optimizar la concentración de CB[6] pero a una concentración más baja del analito (ver IV. 2. 7). A una concentración de ioxynil más baja y la nueva concentración óptima de CB[6] se optimizó el tiempo de deposición (ver IV. 2. 7. 2) que se varió entre 0 y 300 s con un tiempo de equilibrio de 5 s, así como el tiempo de equilibrio con un tiempo de deposición de 300 s. El resto de variables instrumentales se mantuvieron constantes con tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, potencial inicial, incremento de potencial, velocidad de barrido y amplitud de, respectivamente, 0.04 s, 0.5 s, -0.1 V, 9 mV, 18 mV/s y 80 mV.

Las condiciones instrumentales óptimas para la determinación de ioxynil en presencia de CB[6] fueron tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, potencial inicial, incremento de potencial, velocidad de barrido y amplitud de, respectivamente, 300 s, 10 s, 0.04 s, 0.5 s, -0.1 V, 9 mV, 18 mV/s y 80 mV.

III. 5. 2. Electrodo de oro

Previamente a la adsorción del CB[6] se activaba el electrodo mediante voltamperometría cíclica desde 0 a 1.5 V a 0.5 V/s de velocidad de barrido en 0.1 M ácido sulfúrico, electrolito usado en todas las medidas con este electrodo. Tras la activación, se hacían medidas a 100 mV/s en el mismo rango de potencial y desde 0.15 V a 0.8 V, últimos márgenes empleados en la medida de disoluciones con hidroquinona tras la modificación del electrodo con CB[6] o en ausencia de esta tras las medidas en disolución de hidroquinona con el electrodo modificado y lavado del electrodo con agua. El primer margen de potencial también se usó para estudiar la desorción del CB[6] a 100 mV/s [122]. Para la modificación del electrodo, este se sumergía en disolución de CB[6] en 0.1 M sulfato sódico durante un tiempo determinado. Luego se sacaba de la disolución y se lavaba con agua. A continuación se introducía en la disolución de medida.

III. 6. MEDIDAS DE MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS

El proceso de adsorción y lavado fue el mismo que con los electrodos de oro (ver III 5. 2) con la salvedad de que posteriormente el sustrato se secaba con corriente de nitrógeno y que también se usó disolución de CB[6] saturada en agua y disolución de CB[7].

Las medidas se realizaron en modo dinámico con control de la amplitud mediante el sistema de retroalimentación en aire. Se obtuvieron con una resolución mínima de 256 puntos/línea y a una velocidad de 1.2 Hz como máximo. La retirada física de material adsorbido se realizaba aplicando un set-point de 1.5-2.5 V durante 10-20 segundos en un área de 200 nm² a una alta velocidad de barrido (8 puntos/línea a 20 Hz). Tras esto, se

medía en modo dinámico con las condiciones anteriormente expuestas de forma que se incorporase en la medida la zona de la que se había retirado el material.

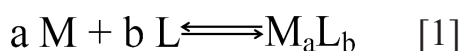
Antes de ser modificadas se hacía el tratamiento de recocción recomendado por la empresa suministradora de los sustratos de oro consistente en situar la placa sobre una llama de butano hasta que el color de placa se hacía cercano al blanco, en una habitación con luz tenue. Se dejaba enfriar la placa durante 30 s y se repetía el proceso varias veces. Después se comprobaba que la superficie de la placa estaba libre de impurezas mediante el microscopio.

Si la placa estaba previamente modificada y para limpiar la superficie antes del tratamiento térmico, la placa se sumergía en disolución piraña (1 volumen de agua oxigenada al 30% y 3 volúmenes de ácido sulfúrico 96%) durante 10 minutos. Posteriormente, se retiraba la disolución y se lavaba varias veces con agua. Finalmente, se sonicaba la placa sumergida en agua durante 5 minutos [123].

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. 1. INTERACCIÓN CADMIO (II) - CUCURBIT[6]URIL MEDIANTE ELECTRODO DE GOTA ESTACIONARIA DE MERCURIO

Para que las reacciones de complejación entre una especie M y un ligando L se puedan usar en Química Analítica han de responder a una estequiometría definida, estequiometría que viene dada por el modelo de reacción que aparece en la Ecuación 1, independientemente de la técnica empleada, de las condiciones instrumentales de la técnica, o de la concentración de analito.



IV. 1. 1. Influencia de la velocidad de barrido, la concentración de cadmio (II) y la concentración de cucurbit[6]uril

Las medidas voltamperométricas en electrodo de gota estacionaria de mercurio a concentración de cadmio (II) fija mostraron que la onda del ión libre disminuía de intensidad en el barrido catódico y se desarrollaba en ambos barridos una nueva onda debida a la interacción entre el Cd (II) y el CB[6] (a potencial más negativo en el barrido de reducción y menos negativo en el barrido anódico) a medida que se aumentaba la concentración de CB[6] en disolución y en 0.1 M ácido sulfúrico, como se observa en la Figura 17. A potenciales bajos y en ambos barridos surgió una onda de adsorción debida al CB[6].

Al variar la velocidad de barrido, la respuesta del sistema Cd (II)-CB[6]-electrodo de mercurio se modificó. Cuanto menor fuese la velocidad de barrido, el descenso en la intensidad de pico del ión libre fue mayor para una misma concentración de CB[6], como se puede observar en la Figura 18. Las intensidades de pico de la onda del Cd (II) libre se normalizaron respecto de la intensidad de pico del ión en ausencia de CB[6] dado que la intensidad límite alcanzada depende de la velocidad de barrido. Este descenso se debió a que cuanto menor fuera la velocidad de barrido, más se favorecía la adsorción del CB[6]. La reacción entre el cadmio (II) y el CB[6] no ocurría en disolución. Se daba la interacción

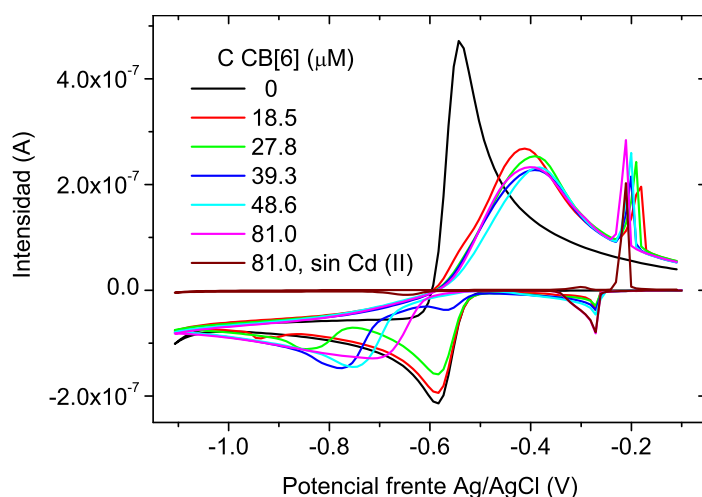


Figura 17. Voltamperogramas en voltamperometría cíclica a 100 mV/s a concentración constante de cadmio (II) de 79.6 μM. Se indica en la gráfica la concentración de CB[6] en disolución (μM). Electrolito: 0.1 M ácido sulfúrico.

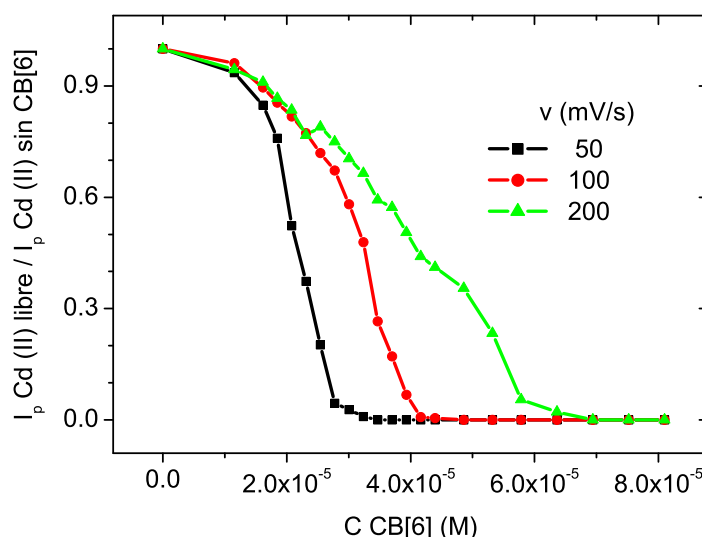


Figura 18. Intensidad de pico normalizada de la onda catódica del cadmio (II) libre a concentración constante de 79.6 μM en voltamperometría cíclica a distintas velocidades de barrido indicadas en la gráfica (mV/s). Electrolito: 0.1 M ácido sulfúrico.

entre ambas especies debida a la adsorción del CB[6] en la superficie del electrodo. Este hecho se puso de manifiesto claramente en voltamperometría diferencial de impulsos, técnica en la cual se obtienen buenos resultados a bajas velocidades de barrido. La adsorción fue mayor, el descenso en la intensidad de pico del cadmio (II) libre se produjo para una menor concentración de CB[6].

Al igual que en medio ácido, se puede observar en la Figura 19 que en 0.2 M tampón amonio/amoniaco pH 9.3 y a concentración constante de Cd (II), el aumento de concentración de CB[6] conllevó la disminución de intensidad de la onda del cadmio (II) libre y a la aparición a un potencial más negativo de una nueva señal debida a la interacción entre el Cd (II) y el CB[6] en el barrido catódico.

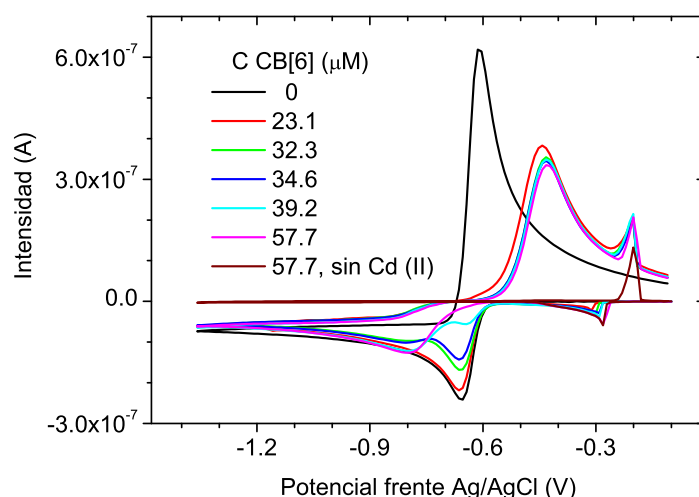


Figura 19. Voltamperogramas a concentración de cadmio (II) constante de 79.6 μM en voltamperometría cíclica a 100 mV/s. En la gráfica aparece la concentración de CB[6] (μM). Electrolito: 0.2 M tampón amonio/amoniaco pH 9.3.

Manteniendo las anteriores condiciones instrumentales y químicas, la interacción entre el cadmio (II) y el CB[6] no respondió a una reacción estequiométrica al variar la concentración de ión metálico. Las intensidades de pico se normalizaron respecto de la intensidad de pico sin CB[6] para cada concentración de cadmio (II) también en este caso, ya que la intensidad límite fue menor cuanto más baja fuese la concentración de catión metálico en disolución. Se observó que la distribución de la señal entre la onda de reducción del Cd (II) libre y la onda catódica debida a la interacción dependía únicamente de la concentración de CB[6], como se muestra en la Figura 20. Tampoco en este caso podemos hablar de estequiometría en la interacción entre el ión del cadmio y el CB[6] puesto que para cada concentración la estequiometría sería distinta, en concordancia con las medidas realizadas en 0.1 M ácido sulfúrico.

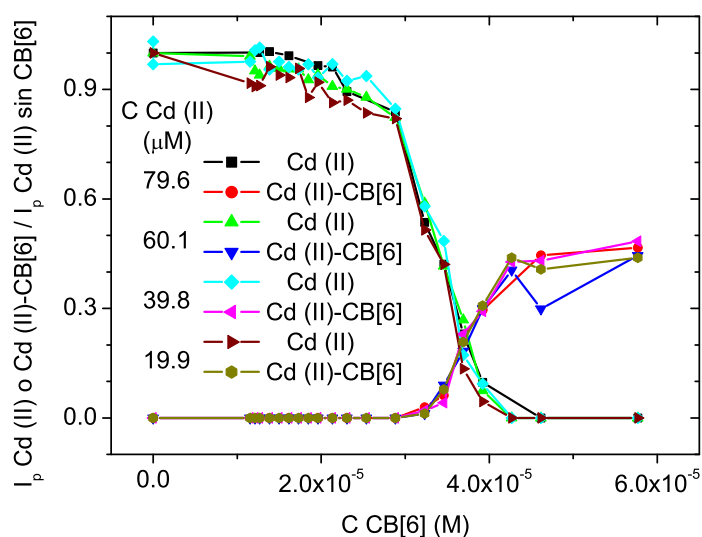


Figura 20. Intensidades de pico catódicas de la onda del Cd (II) libre (Cd (II)) y de la onda debida a la interacción del cadmio (II) con el CB[6] (Cd (II)-CB[6]) normalizadas respecto de la intensidad de pico del cadmio (II) en ausencia de CB[6] para cada concentración de ión metálico, en voltamperometría cíclica a 100 mV/s. En la gráfica aparece la onda representada y la concentración de cadmio (II) (μM). Electrolito: 0.2 M tampón amonio/amoniaco pH 9.3.

Los equilibrios en disolución entre metales y ligandos tienen estequiometrías definidas, como venía expresado en [1]. Si tanto el metal M como el complejo M_aL_b son electroactivos, dependiendo de las concentraciones relativas de cada uno observaremos o desaparecerán las señales de cada una de las especies. Si el ligando L está en defecto, la señal del metal se seguirá observando. Si el ligando está en relación estequiométrica o en exceso, solo se verá la señal del metal complejoado. Este no era el caso que nos ocupaba con el CB[6] como se observa en la Figura 21, voltamperogramas de disoluciones en los que se trabajó a concentración fija de CB[6] y variable de Cd (II). Como se observa, cualquiera que fuese la concentración de ión metálico, la relación de intensidades entre ambas ondas catódicas se mantuvo. La interacción entre el cadmio (II) y el CB[6] dependía únicamente de la concentración de CB[6] y de las condiciones de la técnica.

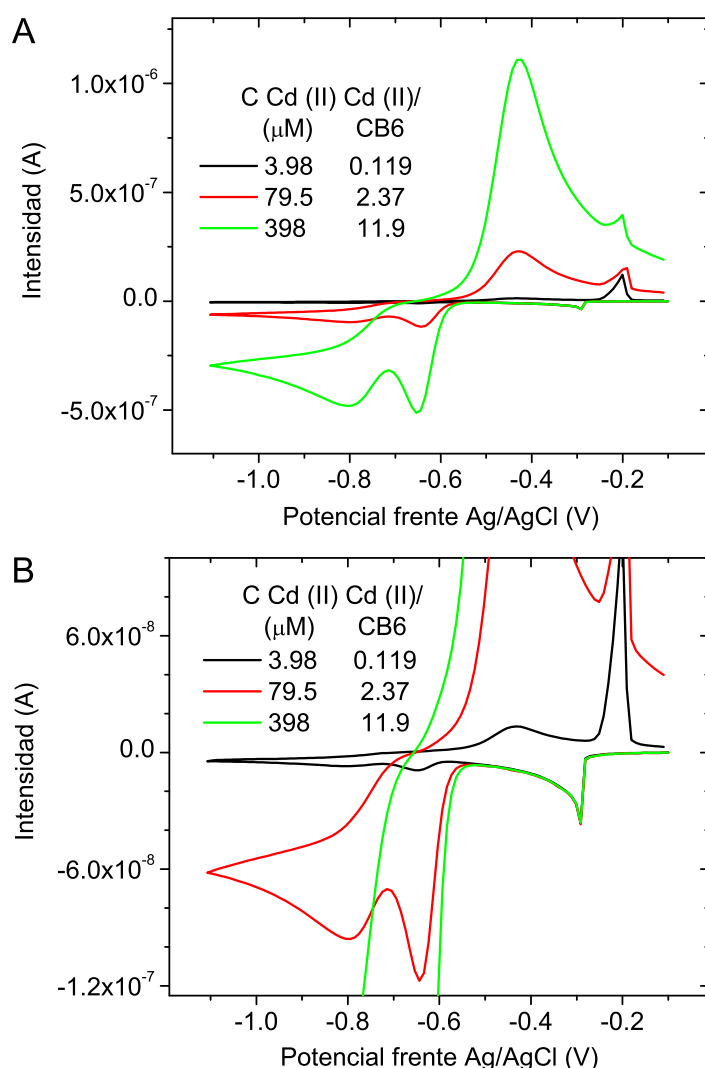


Figura 21. Voltamperogramas en voltamperometría cíclica a 100 mV/s a concentración constante de CB[6] de 33.5 μM. En la gráfica aparece la concentración de cadmio (II) (μM) seguido de la relación molar cadmio (II)/CB[6]. B: ampliación de A. Electrolito: 0.2 M tampón amónico/amoniaco pH 9.3.

Por lo tanto, la interacción de cationes electroactivos en el electrodo de trabajo de mercurio con el CB[6] es un fenómeno superficial y no se puede hablar de estequiometría de la reacción aunque tanto nosotros [124] como otros grupos [17] hayamos usado este electrodo para obtener las estequiometría de la reacción entre el CB[6] con distintos cationes metálicos. Desaparecían y se generaban nuevas ondas debido a la interacción entre el CB[6] en la superficie del electrodo con el metal que llega a la superficie del electrodo para ser reducido. Al llegar a un suficiente recubrimiento de la superficie del

electrodo por el CB[6], lo cual dependía de la técnica empleada, de las condiciones de dicha técnica (como la velocidad de barrido en voltamperometría cíclica) y de la concentración de CB[6] en disolución, la onda del Cd (II) libre desaparecía y se generaba una nueva onda catódica debida a la interacción. La reducción de Cd (II) interaccionando con el CB[6] necesitaba un aporte adicional de energía.

IV. 1. 2. Influencia de la presencia de especies competidoras

La interacción entre el cadmio (II) con el CB[6] se estudió en presencia de distintas especies competidoras como otro ión metálico reducible en el electrodo de trabajo de mercurio. También se usaron distintos electrolitos obtenidos a partir de ácidos o sales que comparten especies como el protón en el caso de los ácidos clorhídrico, sulfúrico y acético, o como el cloruro en el caso del uso de los cloruros de iones alcalinos. También se trabajó con otras especies como la 1,5-pentanodiamina o la isobutilamina que forman con el CB[6] complejos de inclusión.

IV. 1. 2. 1. Zinc (II)

A concentración constante de zinc (II) en tampón amonio/amoniaco pH 9.3, al igual que con el cadmio (II) en 0.1 M ácido sulfúrico o en 0.2 M tampón amonio/amoniaco pH 9.3, el aumento de concentración de CB[6] implicó la disminución de la señal del metal libre y la aparición de una nueva onda a potencial más bajo (en el caso del barrido catódico) debida a la interacción entre el Zn (II) y el CB[6], como se muestra en la Figura 22.

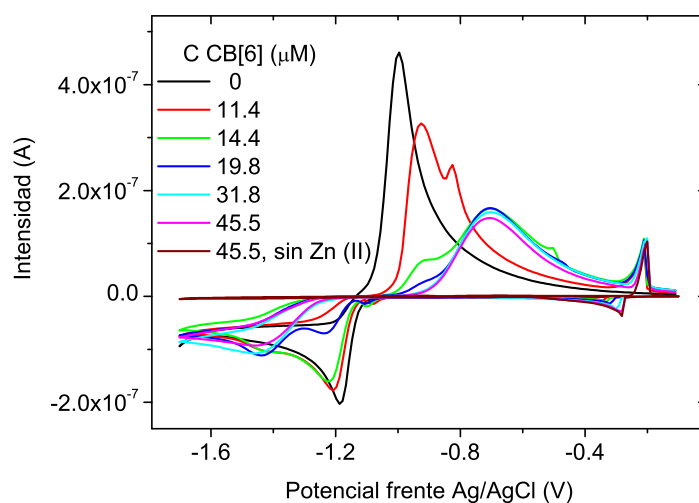


Figura 22. Voltamperogramas en voltamperometría cíclica a 100 mV/s a concentración constante de zinc (II) de 79.2 μM . En la gráfica aparece la concentración de CB[6] (μM). Electrolito: 0.2 M tampón amonio/amoniaco pH 9.3.

Los datos de intensidad y potencial del pico catódico de los estudios realizados para el Cd (II) y para el Zn (II) estudiados independientemente, a concentración similar de cada ión metálico y en medio 0.2 M tampón amonio/amoniaco pH 9.3, se recopilan en la Figura 23. El CB[6] presentó una mayor afinidad por el zinc (II) que por el cadmio (II) dado que la señal catódica del Zn (II) desapareció para una concentración de CB[6] menor y la diferencia de potencial entre la onda del zinc (II) libre y la onda debida a la interacción con el CB[6] en el barrido catódico fue mayor, respecto a lo observado con el Cd (II). Esto era debido al menor tamaño del zinc (II), que conllevaba que un mayor número de iones pudiesen interaccionar con los grupos carbonílicos de las entradas a la cavidad del CB[6].

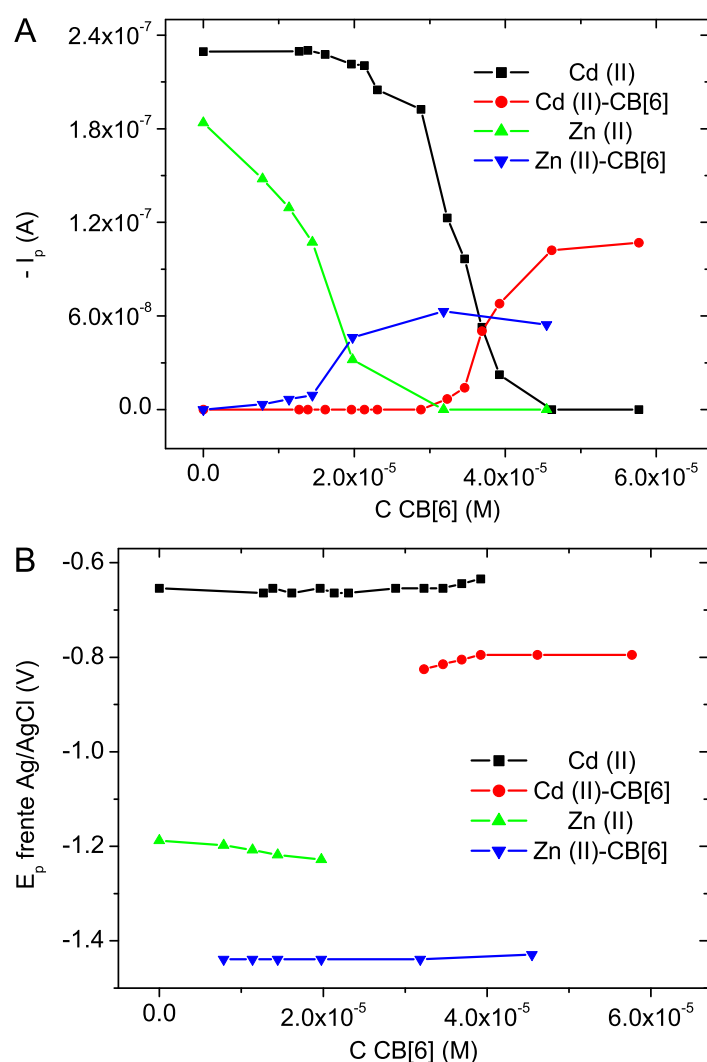


Figura 23. Intensidad y potencial de pico catódico de las ondas de cadmio (II) y de zinc (II) (Cd (II) y Zn (II), respectivamente) y de las ondas catódicas debidas a la interacción entre cada ión metálico con el CB[6] (Cd (II)-CB[6] y Zn (II)-CB[6], respectivamente) de estudios independientes mediante voltamperometría cíclica a 100 mV/s. Las concentraciones de cadmio (II) y de zinc (II) fueron, respectivamente, de 79.6 y 79.2 μ M. En las gráficas aparece la onda representada. A: intensidad de pico; B: potencial de pico. Electrolito: 0.2 M tampón amonio/amoniaco pH 9.3.

Este comportamiento se corroboró en una mezcla de cadmio (II) y zinc (II) a concentraciones equimolares de ambos metales. Como se muestra en la Figura 24, al aumentar la concentración de CB[6] desapareció la onda catódica del Zn (II) libre generándose la onda de reducción debida a la interacción del zinc (II) con el CB[6]. La onda del Cd (II) libre no se modificó para las dos concentraciones más bajas de CB[6]. Para

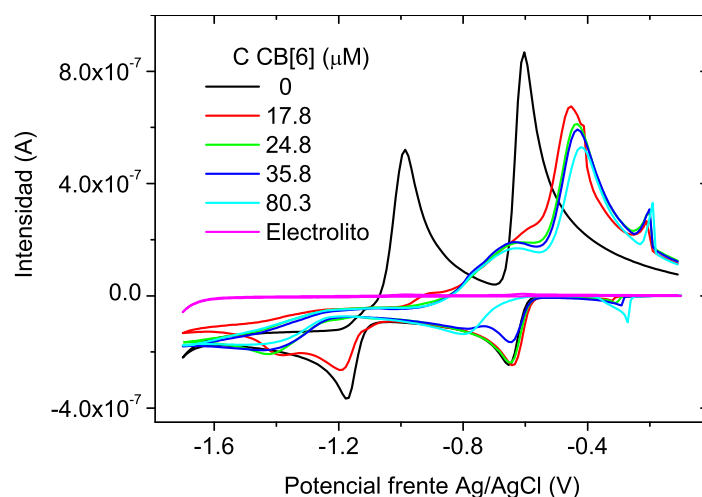


Figura 24. Voltamperogramas de cadmio (II) y zinc (II) a concentraciones constantes de 79.9 y 80.1 μM , respectivamente, en voltamperometría cíclica a 100 mV/s. En la gráfica aparece la concentración de CB[6] (μM). Electrolito: 0.2 M tampón amonio/amoniaco pH 9.3.

concentraciones de CB[6] superiores, la onda catódica del cadmio (II) libre disminuyó de intensidad mientras se formó la onda debida a la interacción entre el Cd (II) y el CB[6] en el barrido de reducción.

Se realizaron estudios de competición considerando esta afinidad diferencial. La presencia de zinc (II) debería llevar a un aumento en la señal catódica del cadmio (II) libre respecto a las medidas de disoluciones con Cd (II) (sin Zn (II)) a una concentración de CB[6] tal para que se produjese una disminución en la señal catódica del Cd (II) libre sin CB[6]. Habiendo disminuido en parte la señal del cadmio (II) libre en el barrido catódico debido a la presencia de CB[6], manteniendo constantes las concentraciones de Cd (II) y de CB[6], el aumento de concentración de zinc (II) debería llevar a la parcial o total restauración de la señal catódica del Cd (II) libre, como si no hubiese CB[6] en disolución puesto que este estaría interaccionando ya con el Zn (II).

Como se puede observar en las gráficas de la Figura 25, en las que se comparan medidas de disoluciones de igual concentración de Cd (II) y CB[6], con y sin Zn (II), esto no fue así, lo cual tampoco nos debería sorprender. Se concluyó en la sección IV. 1. 1 que la señal electroquímica que se obtuviese dependía de la concentración de CB[6] y de las

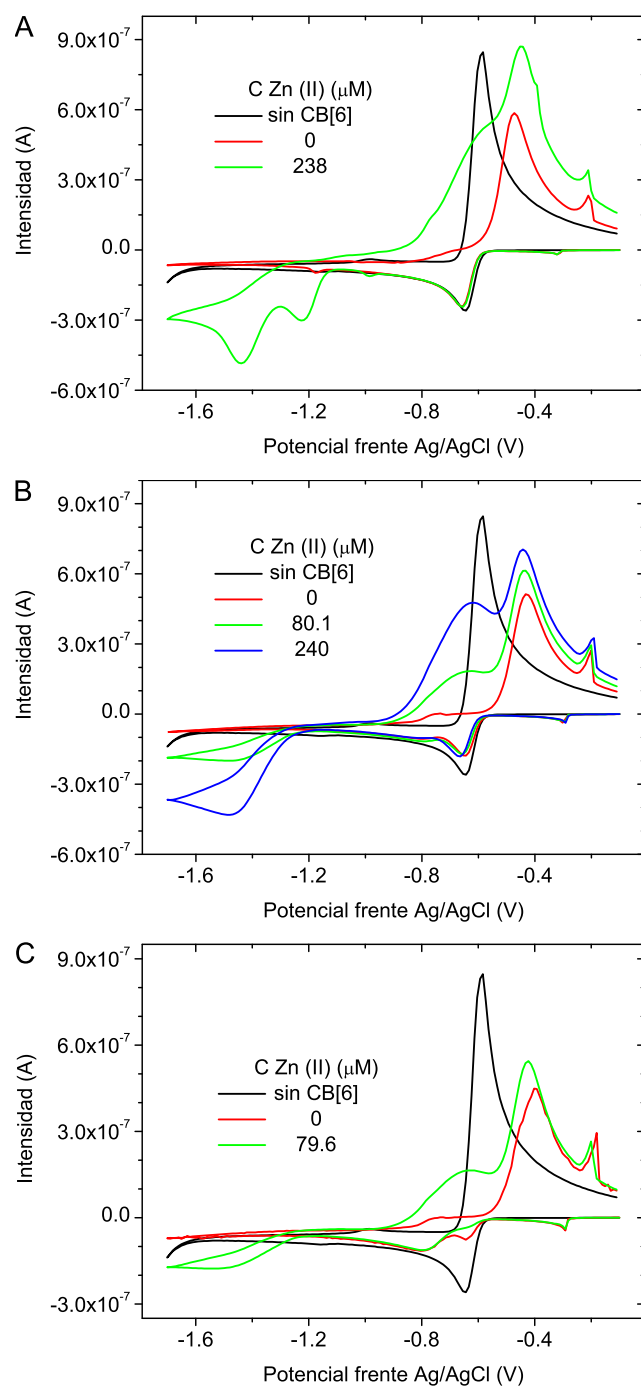


Figura 25. Voltamperogramas a concentración constante de cadmio (II) de 79.9 μM en voltamperometría cíclica a 100 mV/s. En cada gráfica se indica la concentración de zinc (II) (μM). A: concentración de CB[6] de 19.7 μM . B: concentración de CB[6] de 34.6 μM . C: concentración de CB[6] de 39.8 μM . Electrolito: 0.2 M tampón amonio/amoniaco pH 9.3.

condiciones de medida únicamente. Como vimos en la Figura 21, gráficas de voltamperogramas de estudios en los que se varió la concentración de cadmio (II) manteniendo la concentración de CB[6] y las condiciones de la técnica constantes, la relación entre la señal del Cd (II) libre y la señal debida a la interacción en el barrido catódico no variaban. Si no se cambiaban ni la concentración de CB[6] ni las variables instrumentales, no cabía esperar cambio en la señal obtenida. Sin variar las condiciones de la técnica, era la concentración de CB[6] la que imponía qué señales se obtuviesen. Con la especie competidora Zn (II) se comprobó lo mismo.

Como se comentó en la sección III. 5, todas las medidas presentadas se realizaron justo después de la preparación de la disolución. Una de las excepciones fue en el estudio diseñado para descartar una posible influencia en la cinética de la reacción de competición entre el cadmio (II) y el zinc (II). Se prepararon dos disoluciones con y sin Zn (II) que se guardaron durante distintos periodos hasta el momento de las medidas, conteniendo la misma concentración de Cd (II) y de CB[6], habiéndose elegida esta última para que en voltamperometría diferencial de impulsos, que permite una mayor definición de las ondas que se generan, la onda de reducción del Cd (II) estuviese desdoblada en la forma de Cd (II) libre y la onda debida a la interacción. Como se puede observar en las gráficas de la Figura 26, con Zn (II) no se recuperó la señal del Cd (II) libre.

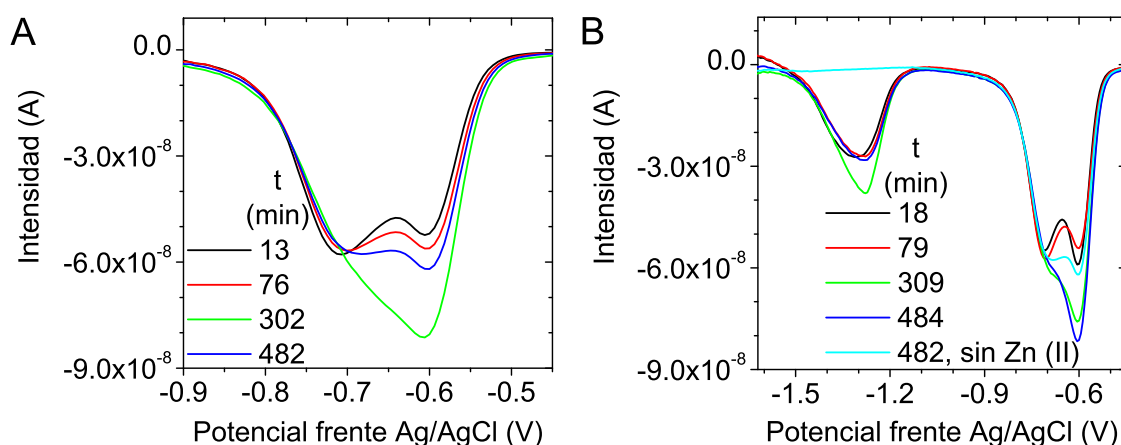


Figura 26. Voltamperogramas en voltamperometría diferencial de impulsos a concentración constante de cadmio (II), zinc (II) y CB[6] de, respectivamente, 79.8, 80.0, 21.4 μ M. En cada gráfica aparece el tiempo transcurrido entre la preparación de la disolución y la medida (minutos). A: medidas de disoluciones sin Zn (II). B: medidas de disoluciones con Zn (II), excepto donde indicado. Electrolito: 0.2 M tampón amonio/amoniaco pH 9.3.

IV. 1. 2. 2. Electrolito

Con el fin de estudiar la posible competición entre iones que interaccionan con los CB[n] por las posiciones en las entradas a la cavidad, se realizaron medidas electroquímicas en distintos electrolitos soporte que nos permitieron indagar en la interacción que se da entre el cadmio (II) y el CB[6] en la superficie del electrodo de trabajo.

IV. 1. 2. 2. 1. Cationes

Presentamos a continuación los resultados de las medidas realizadas con distintas sales de cloruro de iones de metales alcalinos como electrolitos, además del protón (ácido clorhídrico), iones del grupo 1 de la Tabla Periódica. Dos criterios permitieron asignar, de acuerdo a las características de tamaño de los cationes, una escala cualitativa de efecto competidor. A la vez que se exponen los criterios, veamos las gráficas de la Figura 27. El primer criterio fue la aparición de la onda de reducción debida a la interacción entre el Cd (II) y el CB[6], claramente diferenciada de la onda catódica del cadmio (II) libre. Este criterio permitió generar dos grupos de cationes: protón y litio, sodio y potasio por otro, apareciendo y estando ausente la onda de la interacción, respectivamente. El segundo criterio depende de cada grupo anteriormente establecido. En el caso del protón y el litio, cuanto menor fuese la concentración de CB[6] para la que la onda del Cd (II) libre desapareciese en el barrido de reducción y mayor fuera la diferencia de potencial entre la onda del cadmio (II) libre y la onda debida a la interacción en el mismo barrido, menor era el grado de interferencia del ión. En el caso del sodio y del potasio, ese segundo criterio había de ser modificado parcialmente puesto que ni se generó una nueva onda debida a la interacción ni la onda del Cd (II) libre llegó a desaparecer en el barrido de reducción. Así, este segundo criterio fue que cuanto menor intensidad de pico se llegase y cuanto mayor fuera el desplazamiento de la onda del cadmio (II) libre en el barrido catódico, menor era el grado de interferencia. Con estos dos criterios, podemos hacer el siguiente orden de interferencia, de menos a más: protón, litio, sodio y potasio. Este orden de interferencia coincide con el aumento de tamaño de los cationes estudiados del grupo 1 de la Tabla

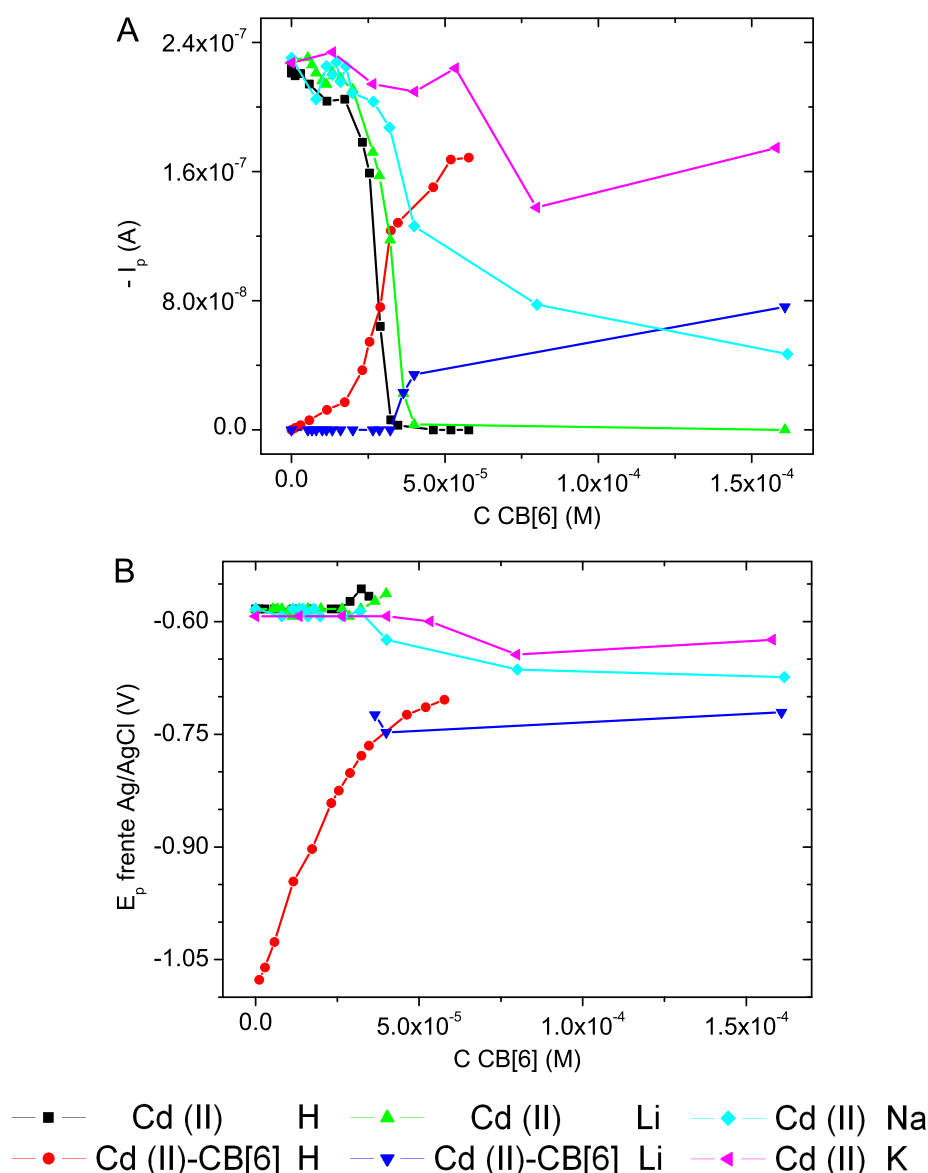


Figura 27. Intensidades y potenciales de pico catódicos en voltamperometría cíclica a 100 mV/s de las ondas del cadmio (II) libre (Cd (II)) y de la onda debida a la interacción (Cd (II)-CB[6]) en distintos electrolitos de sales de cloruro de metales alcalinos, especificados debajo de las gráficas, además del ácido clorhídrico, todos a concentración 0.1 M. La concentración de cadmio (II) se mantuvo constante en 79.7-79.9 μ M. A: intensidades de pico; B: potenciales de pico.

Periódica, metales alcalinos y protón (ver Tabla 4) [125]. El protón puede existir en varios estados: como especie individual con un radio 0.895 fm (10^{-15} m) [126], como H_3O^+ con una distancia de enlace H-O de 97.6 pm (10^{-12} m), aunque su estructura tiene forma de paraguas invirtiéndose los hidrógenos en su dinámica molecular [127], o como especie

Catión	H	Li	Na	K
Radio iónico (pm)	0.000895	78	98	133

Tabla 4. Radios iónicos del protón y de cationes alcalinos [125, 126].

hidratada [128]. Si se considera al protón como especie individual, la diferencia con el ión litio debía haber sido mucho mayor, siendo esto debido a que el CB[6], a diferencia del resto de casos, fue disuelto con un exceso de sodio (ver sección III. 3).

Como ya se comentó en la introducción de los CB[n], varios trabajos han profundizado en el conocimiento de la interacción que se da entre el CB[6] y los metales. Se ha reportado que a mayor tamaño del ión alcalino, menor es la afinidad entre el CB[6] y el ión [28,44]. Trabajando con moléculas que forman complejos de inclusión con el CB[6] hay resultados contradictorios pues en un caso se observa que la constante de afinidad entre la forma protonada de la ciclohexilmetilamina y el CB[6] aumenta al aumentar el tamaño del ión, aplicándose el criterio de disminución de la afinidad CB[6]-catión [19], y en otro caso la constante de afinidad entre el CB[6] y el propanol o la forma protonada de la 1-propilamina disminuye al aumentar el tamaño del ión por lo que el aumento de tamaño provoca que haya menos espacio para alojar a la molécula incluida [40].

Podemos concluir que, aunque disminuye la fuerza del enlace ión-CB[6], a mayor tamaño del ión del grupo 1, se produjo un mejor ajuste entre el catión competidor y las entradas a la cavidad del CB[6], había menos espacio para que se diese la interacción entre el cadmio (II) y el CB[6]. Esto además nos indicaba que el CB[6] se adsorbía en la superficie del electrodo de trabajo como especie catiónica pues de lo contrario no habría habido variaciones con la presencia de distintos cationes en el electrolito.

En estos electrolitos, la especie de Cd (II) predominante es el complejo $[CdCl_4]^{2-}$. Se sabe que los cucurbit[n]uriles interaccionan favorablemente con especies cargadas positivamente, por medio de los oxígenos carbonílicos. Como quedó patente en la sección I. 1, son escasos los ejemplos en los que se da la interacción entre especies cargadas

negativamente y estos macrociclos, y en condiciones específicas como la formación de pares iónicos o la lejanía de las cargas negativas [58-59]. Como no se está en estos casos, hemos de concluir que la interacción se dio, al menos con el complejo con cloruro, tras la liberación de los ligandos coordinados.

IV. 1. 2. 2. 2. Aniones

Se compara el comportamiento electroquímico de reducción del Cd (II) a concentración fija de ión metálico y variable de CB[6] en los electrolitos ácido clorhídrico y ácido sulfúrico, ambos a concentración 0.1 M. Como se muestra en la Figura 28, también en ácido clorhídrico se daba la interacción. Esta fue similar a la observada en las Figuras 17 y 18 en 0.1 M ácido sulfúrico. Fue similar pero era necesaria una mayor concentración de CB[6] en 0.1 M ácido sulfúrico que en 0.1 M ácido clorhídrico para que se diese la total desaparición de la onda de reducción del cadmio (II) libre. Las diferencias observadas se deben al contra-ión del CB[6] presente en la superficie del electrodo. El CB[6] se adsorbe en la superficie del electrodo de mercurio como catión, carga que tiene que ser compensada por aniones presentes en el electrolito cuyo tamaño y carga han de influir en

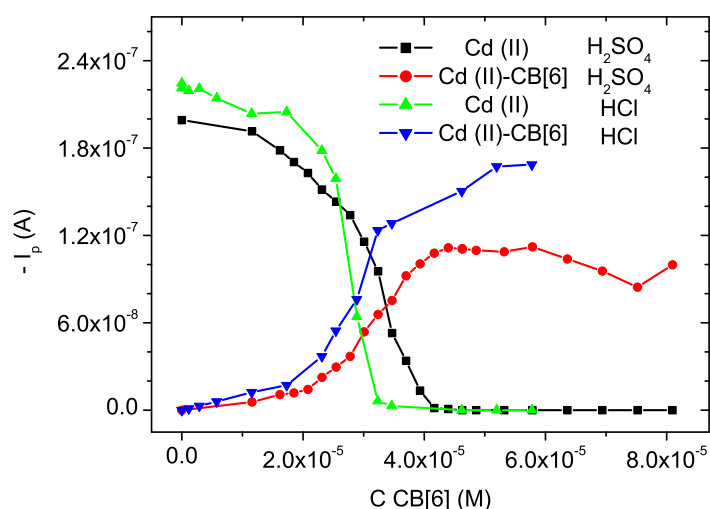


Figura 28. Intensidades de pico de la onda del Cd (II) libre (Cd (II)) y de la onda debida a la interacción entre el Cd (II) y el CB[6] (Cd (II)-CB[6]), en medio ácido sulfúrico y en ácido clorhídrico, ambos 0.1 M, en voltamperometría cíclica a 100 mV/s. Las concentraciones de Cd (II) permanecieron constantes (79.6-79.7 μM).

la interacción entre el Cd (II) y el CB[6]. La presencia del sulfato impidió más la interacción que el cloruro ya fuese por su mayor tamaño ya fuese por la mayor carga negativa que presenta. En la sección IV. 1. 2. 2. 3, en la que se compara al cloruro con el acetato, veremos que prevaleció la carga respecto al tamaño.

IV. 1. 2. 2. 3. Distintas especies

A continuación compararemos el comportamiento electroquímico de reducción del cadmio (II) libre y de la onda debida a la interacción en los electrolitos ácido clorhídrico, ácido acético, tampón acético/acetato, acetato sódico, cloruro sódico, todos a concentración 0.1 M. Los resultados aparecen en la Figura 29.

Como se observa comparando los cambios en las señales de reducción en medio ácido, clorhídrico y acético, en este último no desaparece la onda del Cd (II) libre. Esto fue debido a que el ácido acético forma un complejo de inclusión con el CB[6], aunque con una baja afinidad [40]. Considerando la máxima concentración de CB[6] usada (116 μM) y la concentración de ácido acético en disolución (0.099 M), la relación ácido acético/CB[6] era muy alta (>800), lo que favoreció la formación del complejo. Como veremos más detenidamente en la sección IV. 1. 2. 3, la total formación de dicho complejo de inclusión ácido acético-CB[6] impidió la interacción cadmio (II)-CB[6].

Comparemos el efecto del anión del electrolito, cloruro frente a acetato, siendo el catión el mismo, el sodio. Varios hechos fueron iguales en ambos electrolitos como que las intensidades de pico catódicas de la onda del cadmio (II) libre coincidieron para un rango de concentraciones de CB[6]. También que para altas concentraciones de CB[6], en el barrido de reducción tanto las intensidades como los potenciales de pico de la onda de la interacción en acetato como de la onda del Cd (II) libre en cloruro fueron similares.

La única diferencia fue que en acetato se pudo observar la onda de la interacción a la vez que la onda del Cd (II) libre en el barrido catódico para ciertas concentraciones de

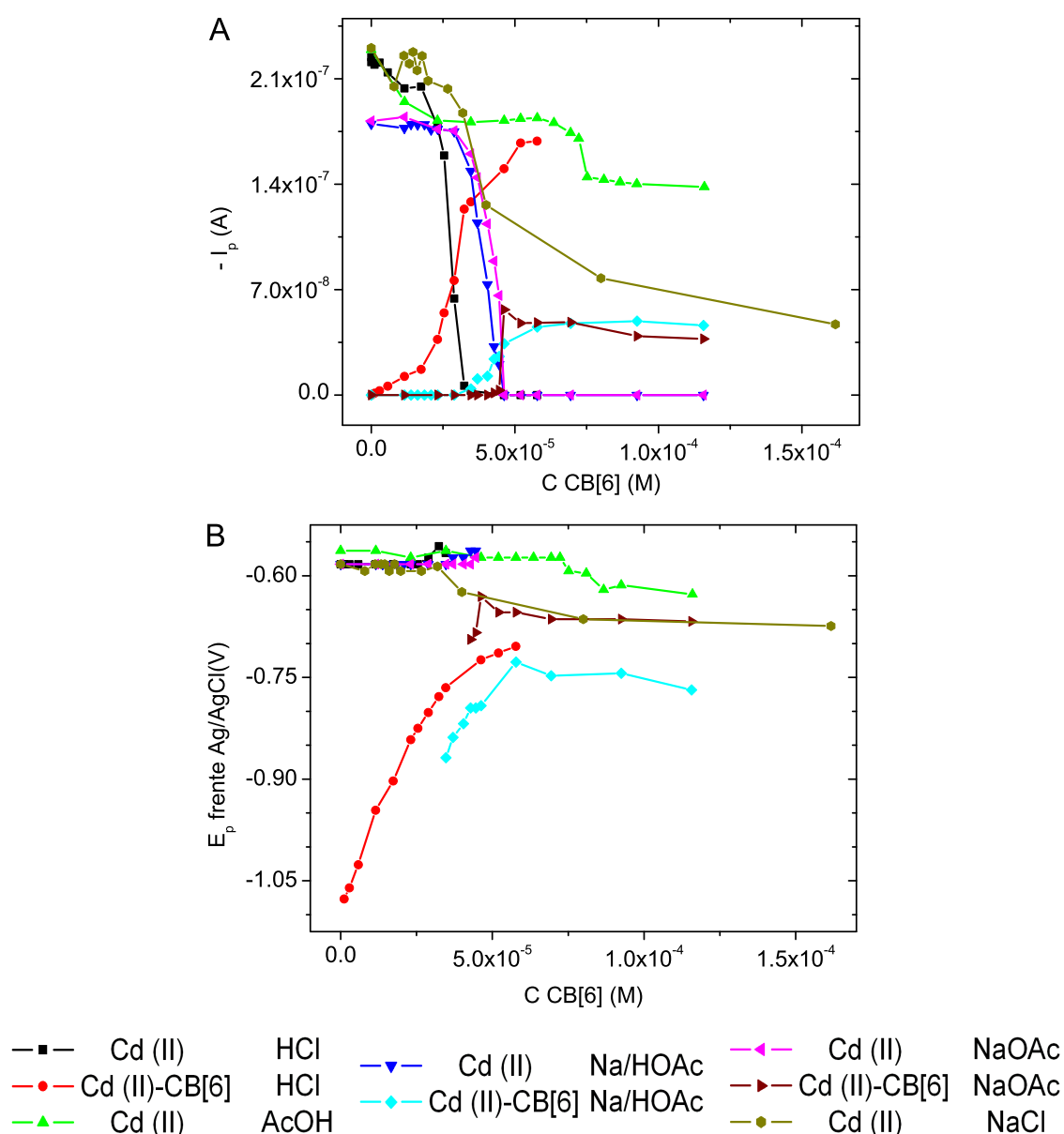


Figura 29. Intensidad y potencial de pico de las ondas del Cd (II) libre (Cd (II)) y de la onda debida a la interacción (Cd (II)-CB[6]) en el barrido catódico de voltamperogramas cíclicos a 100 mV/s en distintos electrolitos, indicados debajo de las gráficas. La concentración de cadmio (II) varió entre 79.2 y 79.9 μ M. A: intensidad de pico; B: potencial de pico.

CB[6], a diferencia de con cloruro con el que solo se observó la onda del cadmio (II) libre. Considerando el primer criterio para establecer diferencias entre cationes de metales alcalinos y el protón (sección IV. 1. 2. 2. 1), el cloruro impidió más la interacción que el acetato aunque el primero presente un menor tamaño respecto al segundo. Así, a igual

carga, el acetato por su mayor tamaño no se ajustaba adecuadamente a los cationes unidos al CB[6], dejaba espacio para que el Cd (II) interaccionase. Por lo tanto, en el caso de la comparativa entre el sulfato y el cloruro de la sección IV. 1. 2. 2, aunque el sulfato presenta un mayor tamaño que el cloruro, su mayor carga negativa generaba una mayor atracción con los protones que se unían a las entradas del CB[6] impidiéndose la interacción con el cadmio (II).

Sabemos que el sodio impidió más la interacción que el protón al igual que ocurría con la presencia de ácido acético. Comparando las medidas realizadas en ácido acético y en el tampón ácido acético/acetato, hubo efectos que se contrarrestaron. Considerando que en el tampón se observó en el barrido catódico la onda debida a la interacción y que el desplazamiento de potencial observado fue mayor, el tampón impidió menos la interacción que el ácido. La concentración de acético pasó de 0.99 a 0.05 M, aunque la concentración de sodio aumentó. La disminución de concentración de ácido acético en disolución fue suficiente para que no se formara el complejo de inclusión ácido acético-CB[6], se observase así la onda catódica debida a la interacción y que se diera un mayor desplazamiento de potencial catódico respecto a en ácido acético. En los electrolitos tampón ácido acético/acetato y en acetato sódico el comportamiento que se obtuvo fue muy similar por la misma razón pero la onda catódica de la interacción aparecía a potenciales más negativos en el caso del tampón por lo que la interacción se impidió menos en este medio.

IV. 1. 2. 3. Ácido acético, isobutilamina y 1,5-pentano-diamina

Estas moléculas forman complejos de inclusión con el CB[6]. Uno de los sitios de interacción con el CB[6] son las entradas a la cavidad, por lo que, junto con los resultados ya expuestos, nos permitió conocer qué mecanismo había detrás de la adsorción del CB[6] en el electrodo de mercurio y cómo se daba la interacción con el cadmio (II).

En primer lugar hay que destacar la afinidad con que se da la interacción. El ácido

acético presenta una cadena alquílica corta y el grupo carboxílico no permite establecer el mismo tipo de interacciones como las que se dan con grupos amonio terminales. Por ser la cadena más corta, el efecto hidrofóbico (suma de interacciones de Van der Waals y aumento de entropía por desolvatación de la cavidad y de al menos parte de la molécula incluida) que se da es de menor cuantía. Mientras con las dos aminas empleadas la interacción es del tipo ión-dipolo, en el caso del acético la interacción viene mediada por cationes del electrolito, una interacción más débil. Por lo tanto, la constante de formación entre el CB[6] y el ácido acético es menor que con cualquiera de las dos aminas y es necesario un exceso de ácido para que todo el CB[6] presente en disolución esté unido a AcOH [18,40].

El otro aspecto a destacar es con cuántas entradas a la cavidad puede interaccionar cada molécula. La 1,5-pentanodiamina (cadaverina) interacciona con ambas entradas mientras que la isobutilamina solo con una y no es posible la inclusión de dos moléculas de isobutilamina (cada una alojada por cada entrada) pues la cadena es demasiado larga [18]. El ácido acético podría incluirse por cada lado de la cavidad por su menor longitud de cadena, aunque esta posibilidad no ha sido considerada previamente en el estudio pormenorizado de la complejación de diferentes moléculas por el CB[6] [40].

Para estudiar el comportamiento del sistema cadmio (II)-CB[6]-ácido acético, se trabajó a concentración constante de ión metálico y de CB[6] en 0.1 M ácido sulfúrico, electrolito escogido para que la especie predominante del sistema acético/acetato fuese el ácido acético, pues el acetato no se incluye debido a la repulsión electrostática con los grupos carbonilo del CB[6]. Como se muestra en la Figura 30, el aumento de concentración de ácido acético condujo al desplazamiento de la onda catódica debida a la interacción entre el Cd (II) y el CB[6] hacia potenciales menos negativos a la vez que aumentaba de intensidad. Para una concentración de ácido acético unas 500 veces superior a la de CB[6] se recuperó totalmente la señal de reducción del Cd (II) libre, como si no hubiese CB[6] en disolución. En la Figura 31 podemos observar los cambios de intensidad y potencial de pico de esta onda de reducción.

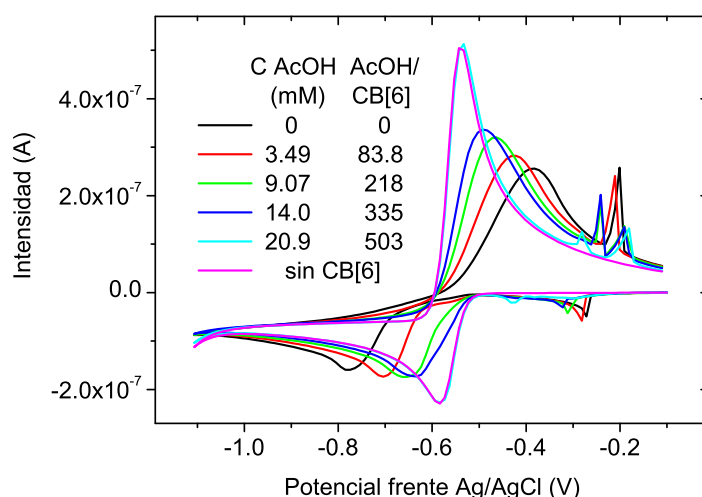


Figura 30. Voltamperogramas en voltamperometría cíclica a 100 mV/s a concentración de Cd (II) y CB[6] constantes de 79.6 y 41.6 μM , respectivamente, excepto en el caso indicado. En la gráfica aparece la concentración de ácido acético en disolución (mM) y la relación molar AcOH/CB[6]. Electrolito: 0.1 M ácido sulfúrico.

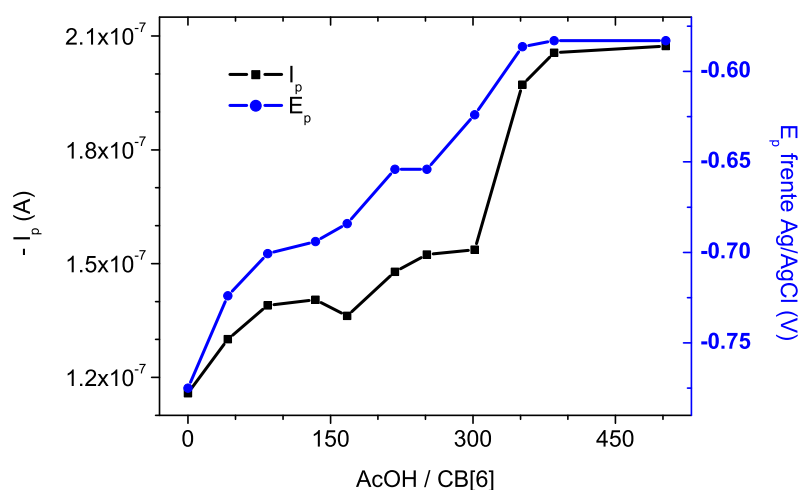


Figura 31. Intensidad y potencial de pico de la onda de reducción del Cd (II) en voltamperometría cíclica a 100 mV/s a concentración de Cd (II) y CB[6] constantes de 79.6 y 41.6 μM , respectivamente. Electrolito: 0.1 M ácido sulfúrico.

Con las dos aminos también se trabajó en medio ácido (0.1 M ácido clorhídrico) para que las especies predominantes fuesen sus formas con grupos amonio y a concentración constante de Cd (II). La interacción del sistema del cadmio (II)-CB[6] con la 1,5-pentanodiamina se estudió a tres concentraciones de CB[6]: 79.7, 39.8 y 29.4 μM . Se usaba, respectivamente, un gran exceso de CB[6] observando solo la onda catódica

debida a la interacción, la concentración de CB[6] para la que la onda de reducción del Cd (II) libre desaparecía y una concentración tal para que se observasen claramente ambas ondas catódicas, como se mostró en la Figura 28. Con la isobutilamina se trabajó a la concentración intermedia de CB[6].

Como se observa en el barrido catódico de los voltamperogramas de la Figura 32, para 0.0251 equivalentes de cadaverina (relación molar cadaverina/CB[6] estudiada más baja) la onda catódica del Cd (II) libre apareció, aunque a un potencial menor que en ausencia de CB[6]. Al aumentar la concentración de la amina, la onda de la interacción en el barrido catódico disminuyó de intensidad hasta desaparecer mientras que la de reducción del cadmio (II) libre aumentaba y se desplazaba a potenciales menos negativos. Trabajando a la misma concentración constante de CB[6], se observaron los mismos cambios en las ondas catódicas con la isobutilamina.

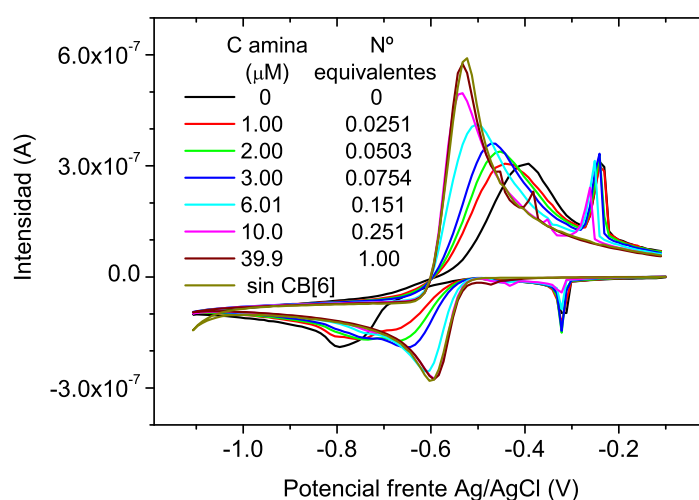


Figura 32. Voltamperogramas en voltamperometría cíclica a 100 mV/s a concentración fija de Cd (II) (79.8 μM) y de CB[6] (39.8 μM). En la gráfica aparece la concentración de cadaverina (μM) y la relación molar cadaverina/CB[6] (equivalentes de cadaverina), respectivamente. Electrolito: 0.1 M ácido clorhídrico.

En el caso de la concentración de CB[6] más baja estudiada y sin cadaverina en el medio, ambas ondas catódicas fueron visibles y el aumento de concentración de cadaverina llevó también a la disminución de la onda de la interacción y al aumento de intensidad de la onda del cadmio (II) libre, manteniendo esta última el potencial de pico catódico del Cd (II) sin CB[6]. A diferencia de las dos concentraciones de CB[6] anteriores, el aumento de concentración de cadaverina en presencia de un gran exceso de CB[6] no llevó a la aparición de la onda de reducción del cadmio (II) libre sino al desplazamiento de la onda de la interacción en el barrido catódico hacia potenciales menos negativos y al aumento de su intensidad de pico, al igual que sucedía con el aumento de concentración de ácido acético (Figura 30). Por esto, en la Figura 33 se representan los valores de intensidad y potencial de pico de la onda catódica del cadmio (II) libre, excepto en el caso de la concentración más alta de CB[6] para la que se representan los valores característicos de la onda catódica debida a la interacción.

Con la cadaverina, cualquiera que fuese la concentración de CB[6], la estabilización de la señal catódica representada en la Figura 33 se produjo a los valores de intensidad y potencial de pico del Cd (II) libre sin presencia de CB[6]. Con la isobutilamina esto no sucedió. La estabilización se producía sin haber alcanzado los valores característicos de la dicha señal en ausencia de CB[6], por más isobutilamina que estuviese presente en disolución (hasta 20.0 de relación molar amina/CB[6], equivalentes). Así, considerando los resultados obtenidos con las tres moléculas usadas, podemos concluir:

- 1) Ambas entradas a la cavidad, los conjuntos de grupos carbonílicos de cada entrada, estaban implicados en la interacción entre el cadmio (II) y el CB[6].
- 2) Dos moléculas de ácido acético interaccionaban con el CB[6].

El otro aspecto a destacar es que con las dos aminas la recuperación (en el caso de la cadaverina) o estabilización de la señal catódica (isobutilamina) se produjo para concentraciones de la amina inferiores a las que impone su relación estequiométrica pues la reacción entre el CB[6] y estas aminas, tanto con cadaverina como con isobutilamina, es

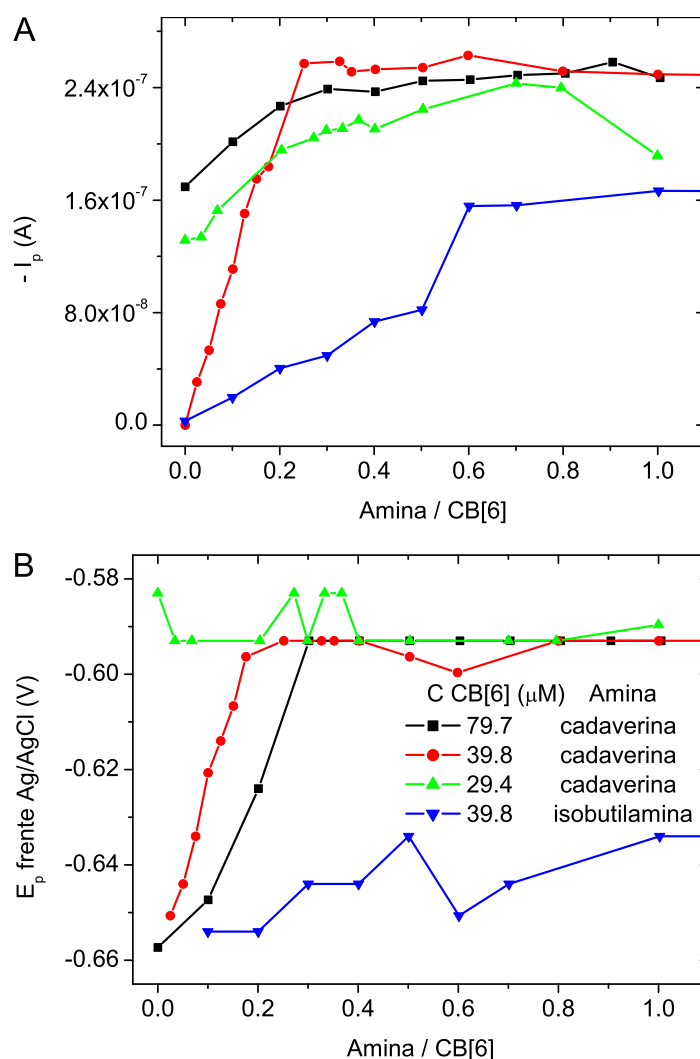


Figura 33. Intensidad y potencial de pico catódico de la onda del Cd (II) libre (excepto 79.7 μ M CB[6], onda de la interacción Cd (II)-CB[6]) en voltamperogramas de voltamperometría cíclica a 100 mV/s a concentración fija de Cd (II) (79.8 μ M). En la gráfica de potencial de pico aparecen la concentración de CB[6] (μ M) y la amina usadas. A: intensidad de pico; B: potencial de pico. Electrolito: 0.1 M ácido clorhídrico.

1:1. La recuperación o estabilización de la señal catódica ocurría para relaciones molares amina/CB[6] inferiores a 1, se producía entre 0.2 y 0.6 equivalentes.

Quedó patente en la sección IV. 1. 2. 2. 1 que el CB[6] se adsorbía como especie catiónica en el electrodo de mercurio. En nuestras condiciones de presencia de cationes del electrolito (sodio y protones) y aminas cargadas positivamente, había dos poblaciones de

moléculas de CB[6] en disolución, una con la amina incluida ([CB[6]-isobutilamina]⁺ o [CB[6]-cadaverina]²⁺) y otra con el CB[6] conteniendo en la o las entradas de la cavidad uno o varios cationes del electrolito ([CB[6]-cation_n]ⁿ⁺). La primera población presentaba de manera más permanente en el tiempo la o las cargas positivas, respecto a los complejos con cationes metálicos. La adsorción de la primera población era más favorable pues al presentar esas cargas positivas más permanentemente la adsorción fue más efectiva. El complejo [CB[6]-amina]ⁿ⁺ desplaza al [CB[6]-cation_n]ⁿ⁺ de la superficie, aunque los primeros fuesen minoritarios en disolución. Las moléculas de CB[6] con amina incluida no podían interactuar con el cadmio (II), totalmente en el caso de la cadaverina, parcialmente con la isobutilamina.

Esto se refuerza con el hecho de que la estabilización en los valores de la señal mostradas en la Figura 33 no sucedió para el mismo número de equivalentes. Con la cadaverina se produjo la recuperación de la señal para un número de equivalentes inferior que el número de equivalentes para el cual las señales en el caso de la isobutilamina se estabilizaban. Con la isobutilamina era necesario que se aumentara más la concentración del complejo [CB[6]-isobutilamina]⁺ en disolución para que se desplazase totalmente al [CB[6]-cation_n]ⁿ⁺ de la superficie del electrodo.

IV. 2. INTERACCIÓN ENTRE 3,5-iodo-4-HIDROXIBENZONITRILLO Y CUCURBIT[6]URIL MEDIANTE ELECTRODO DE GOTA ESTACIONARIA DE MERCURIO

IV. 2. 1. Estudio previo

Antes de exponer los resultados de la optimización de las condiciones para la detección de ioxynil mediante electrodo de gotas de mercurio, en ausencia y presencia de CB[6], hemos de conocer qué tipo de proceso electroquímico se daba. Como se puede observar en la Figura 34, la reducción del ioxynil es un proceso irreversible químicamente pues en el barrido anódico no apareció ninguna onda, excepto la de oxidación de ioduro [103].

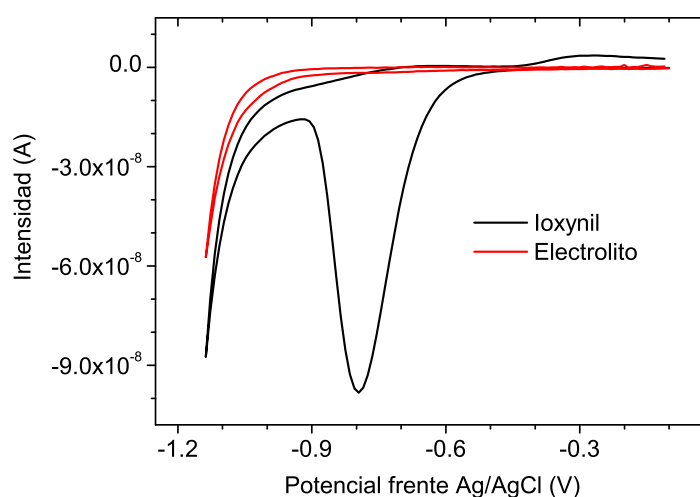


Figura 34. Voltamperogramas obtenidos por voltamperometría cíclica a 100 mV/s de ioxynil 10.0 μM. En la gráfica se indica la disolución medida. Electrolito: 0.01 M ácido fosfórico.

La obtención del número de electrones de la reducción electroquímica del ioxynil se estudió comparando el potencial de semionda obtenido mediante barrido lineal de potencial con goteo del electrodo de gotas de mercurio (Figura 35) y el potencial de pico obtenido mediante voltamperometría diferencial de impulsos (80 mV de amplitud de impulso). Los valores obtenidos fueron de, respectivamente, -0.797 y -0.749 V. Estos valores vienen expresados como $E_{1/2}$ y $E_{p,DPV}$ en [2] (obtenida de [129]), respectivamente,

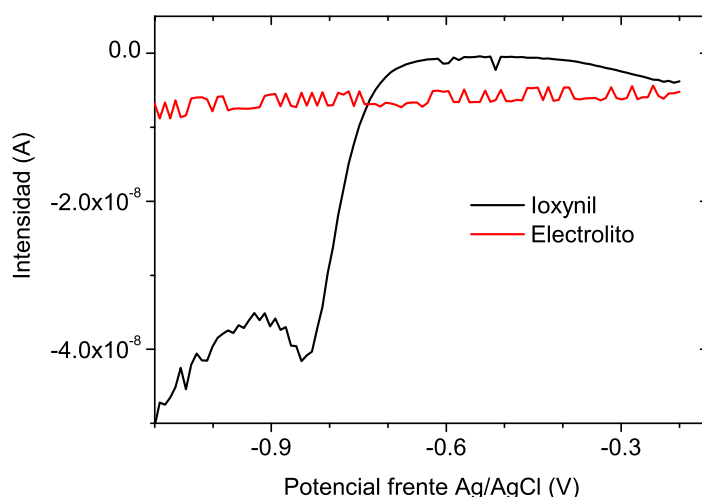


Figura 35. Voltamperogramas usando la técnica de barrido lineal de potencial y con goteo de mercurio. La concentración de ioxynil era de 10.0 μM . Electrolito: 0.5 M tampón fósforo pH=6.1.

$$n = \frac{\text{Amplitud}_{DPV}}{E_{p,DPV} - E_{1/2}} \quad [2]$$

con 0.08 V como Amplitud_{DPV} . El valor de n fue de 1.67, cercano a los 2 electrones que reporta la bibliografía [103].

IV. 2. 2. Influencia del pH y la concentración de cucurbit[6]uril

Como se expuso en la sección III. 4, se estudió el efecto del pH en las señales electroquímicas del ioxynil, sin y con CB[6]. En la Figura 36 aparecen los voltamperogramas de ioxynil sin CB[6] a los pH estudiados mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Como se muestra en la Figura 37, la máxima intensidad del pico 1 sin CB[6] se daba para un pH de 6.1 y así este pH fue el elegido para la optimización del resto de variables químicas e instrumentales en ausencia de CB[6]. En dicha gráfica también se observa que la relación entre el potencial de pico de la onda 1 con el pH correspondió a un proceso en el que se intercambiaban 2 electrones por protón.

En la Figura 38 aparecen los voltamperogramas a concentración constante de ioxynil y de CB[6] para los distintos pH medidos. Dado que la máxima intensidad de señal

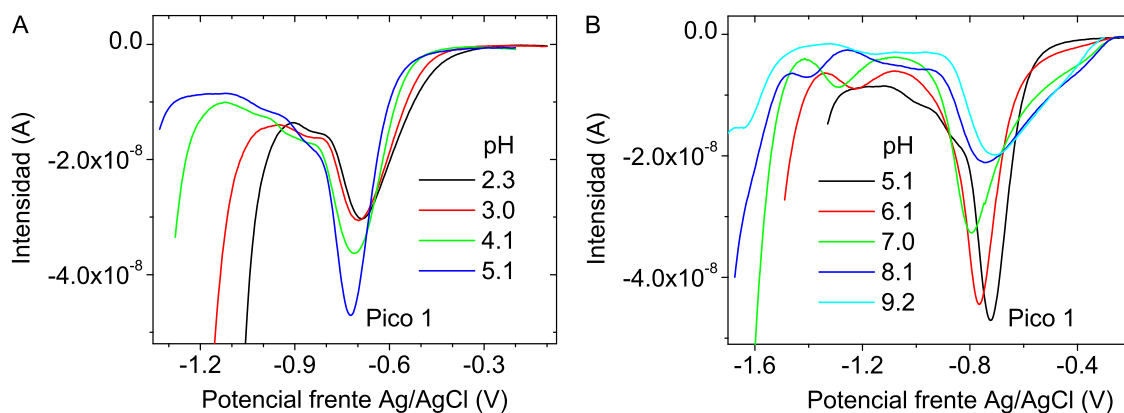


Figura 36. Voltamperogramas de voltamperometría diferencial de impulsos de 10.1 μM ioxynil sin CB[6] a los distintos pH estudiados, indicados en las gráficas. Electrolitos a concentración 0.01 M.

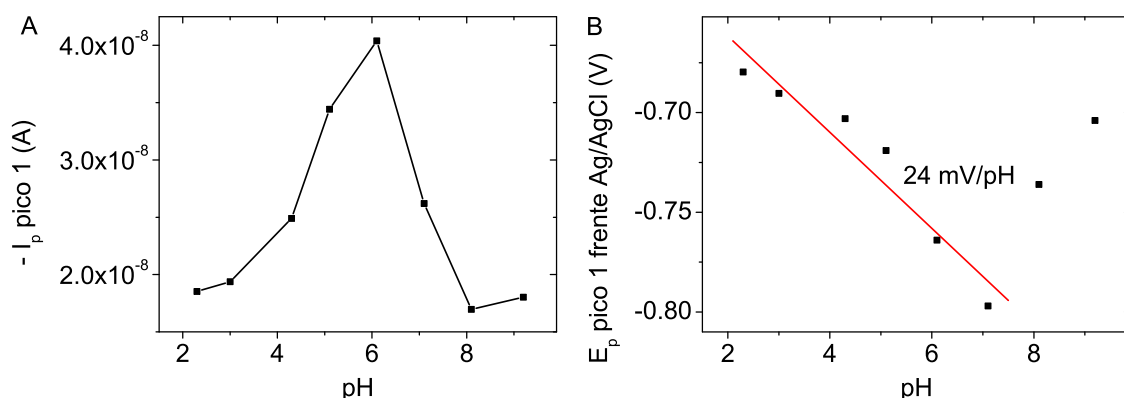


Figura 37. Intensidad y potencial de pico de la onda 1 del ioxynil (10.1 μM) en ausencia de CB[6] en voltamperometría diferencial de impulsos. A: intensidad de pico; B: potencial de pico, aparece la pendiente del ajuste. Electrolitos a concentración 0.01 M.

se daba a un pH de 4.2, este fue el escogido para la optimización de las variables químicas e instrumentales en presencia de CB[6], como se muestra en la Figura 39. En dicha gráfica también se puede observar que el ioxynil intercambiaba el mismo número de electrones que de protones, ningún protón por electrón transferido y la mitad de protones que de electrones, en función del pH.

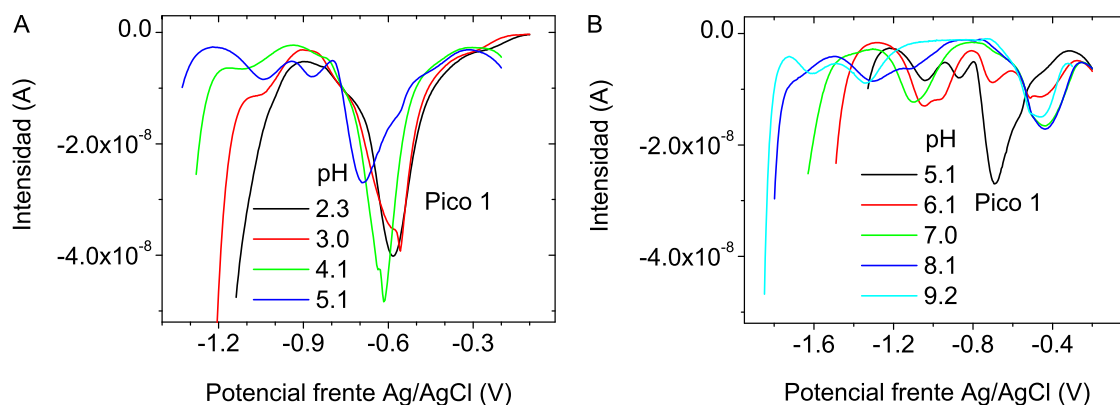


Figura 38. Voltamperogramas de voltamperometría diferencial de impulsos de $10.1 \mu\text{M}$ ioxynil y $10.2 \mu\text{M}$ CB[6] a los distintos pH estudiados, indicados en las gráficas. Electrolitos a concentración 0.01 M .

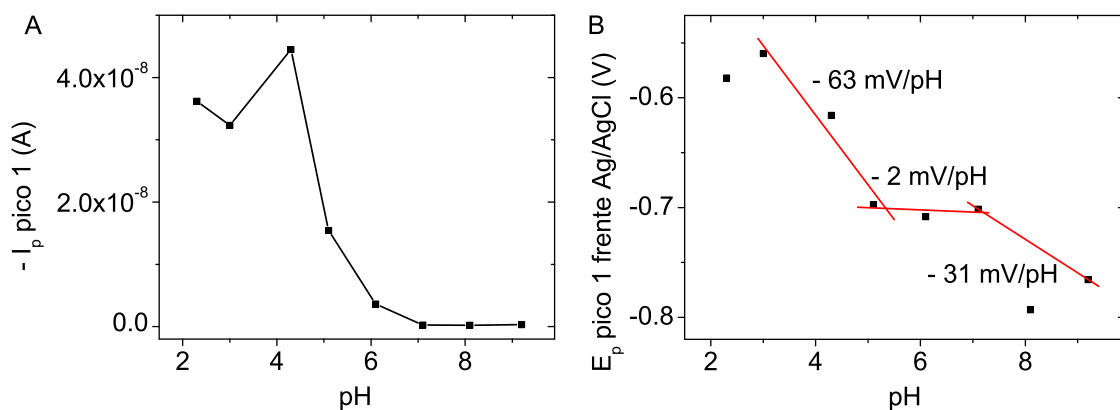


Figura 39. Intensidad y potencial de pico de la onda 1 del ioxynil ($10.1 \mu\text{M}$) en presencia de $10.2 \mu\text{M}$ CB[6] en voltamperometría diferencial de impulsos. A: intensidad de pico; B: potencial de pico, aparecen las pendientes de los ajustes. Electrolitos a concentración 0.01 M .

En la Figura 40 aparecen los voltamperogramas medidos para el tampón ácido acético/acetato pH 4.2 a concentración constante de ioxynil y variable de CB[6]. En la Figura 41 se observa que el pico 1 presentaba intensidades y potenciales de pico estables a partir de 20 μM de CB[6], concentración que fue elegida para la optimización del resto de variables.

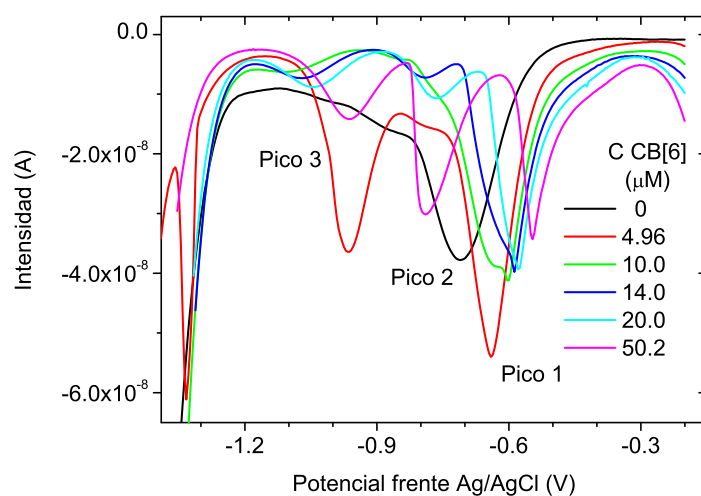


Figura 40. Voltamperogramas de voltamperometría diferencial de impulsos a concentración fija de ioxynil de 10.0 μM . En la gráfica aparece la concentración de CB[6] (μM). Electrolito: 0.01 M tampón acético/acetato pH 4.2.

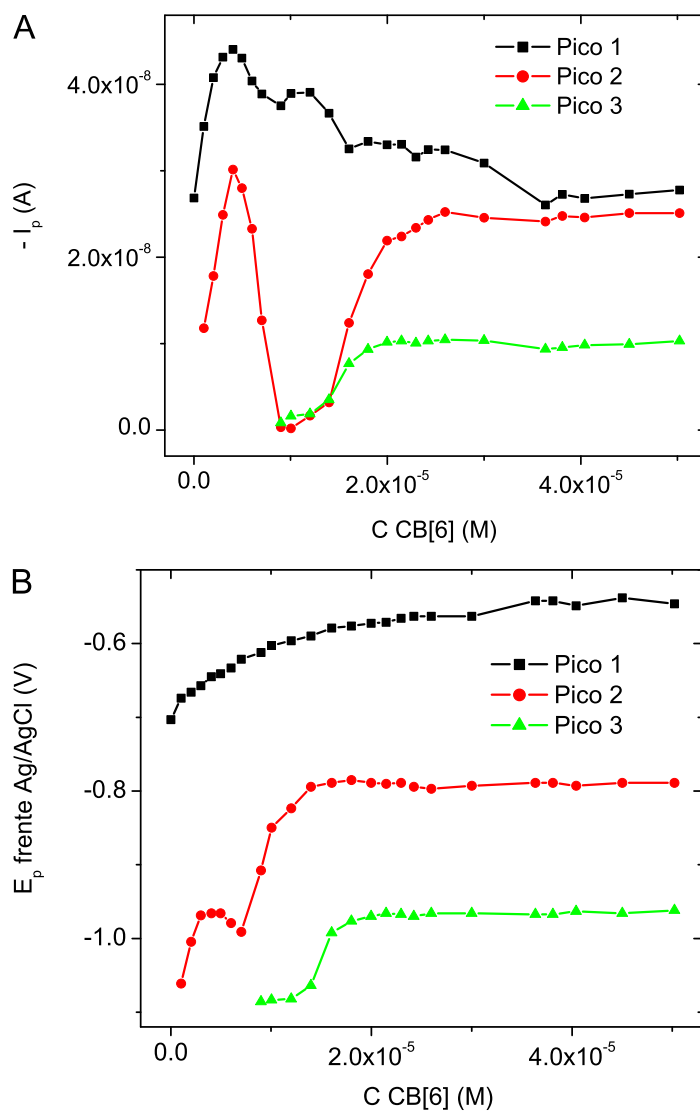


Figura 41. Intensidad y potencial de pico de las ondas del ioxynil a concentración constante de $10.0 \mu\text{M}$ mediante voltamperometría diferencial de impulsos frente a la concentración de CB[6]. En las gráficas aparece la onda representada. A: intensidad de pico; B: potencial de pico. Electrolito: 0.01 M tampón acético/acetato pH 4.2.

IV. 2. 3. Influencia de la presencia de 1,5-pentanodiamina

Al igual que en el estudio de la interacción entre el cadmio (II) y el CB[6], el uso de la 1,5-pentanodiamina (cadaverina) nos permite profundizar en la interacción entre el ioxynil y el CB[6]. Si se formaba el complejo de inclusión o no. Como se puede observar en la Figura 42, la adición de cadaverina a concentración constante de CB[6] y de ioxynil no condujo a la recuperación de la señal de ioxynil en ausencia de CB[6] por lo que las interacciones que se daban entre el CB[6] y el ioxynil no eran debidas a la formación de un complejo de inclusión ya que se sabe que la cadaverina se aloja en la cavidad.

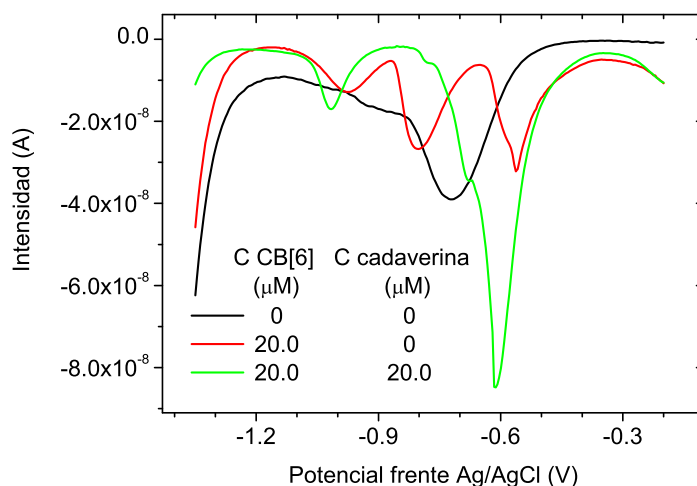


Figura 42. Voltamperogramas a concentración constante de ioxynil de 10.0 μM, sin CB[6] ni cadaverina, con CB[6] y sin cadaverina, y con CB[6] y cadaverina. En la gráfica aparece la concentración de CB[6] y de cadaverina (μM). Electrolito: 0.01 tampón acético/acetato pH 4.2

IV. 2. 4. Influencia de la concentración de electrolito soporte

Esta variable química se estudió tanto sin CB[6] en tampón fosfato pH 6.1 como con CB[6] en tampón acético/acetato pH 4.2, resultados que aparecen en la Figura 43. En ambos casos, el aumento de concentración de electrolito condujo al aumento de la señal de interés. Se escogieron para el resto de optimizaciones las concentraciones de 0.5 y 0.05 M para el tampón fosfato pH 6.1 y el tampón acético/acetato pH 4.2 en ausencia y presencia de CB[6], respectivamente. El resultado en presencia de CB[6] implica que el analito no entraba en la cavidad estableciendo interacciones con los grupos carbonílicos. En los casos

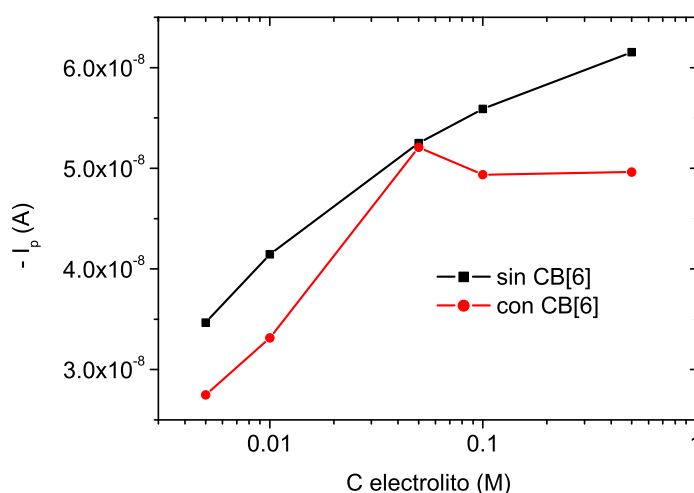


Figura 43. Intensidad de pico de la onda 1 del ioxynil a concentración de 10.0-10.1 μM sin CB[6] y con CB[6] (20.0 μM) frente a la concentración de electrolito en voltamperometría diferencial de impulsos. Electrolito: tampón fosfato pH 6.1 (sin CB[6]) y tampón acético/acetato pH 4.2 (con CB[6]).

en los que se dan interacciones ión-dipolo entre la molécula incluida y los CB[n], los cationes compiten por estas posiciones [19,42].

IV. 2. 5. Optimización de las condiciones instrumentales

Una vez optimizadas las variables químicas (pH y concentración de electrolito) que afectan a la detección electroquímica del ioxynil, se procedió a estudiar la dependencia de la señal con las variables instrumentales de la técnica empleada, la voltamperometría diferencial de impulsos.

IV. 2. 5. 1. Tiempo entre impulsos y tiempo de impulso a velocidad de barrido constante

La variación del tiempo entre impulsos a incremento de potencial constante lleva a la variación de la velocidad de barrido pues la división del incremento de potencial entre el tiempo entre impulsos da la velocidad de barrido. Por esto, al cambiar el tiempo entre impulsos se varió el incremento de potencial para que la velocidad de barrido fuese constante, velocidad de barrido que posteriormente se optimizó. Los datos de interés, intensidad de pico y anchura de semipico, se pueden observar en la Figura 44. Como se

puede observar, para un mismo tiempo entre impulsos, cuanto menor fuese el tiempo de impulso se obtenía una mayor intensidad de pico aunque también algo más de anchura de semipico. Para un mismo tiempo de impulso, más intensidad cuanto mayor fuese el tiempo entre impulsos, con muy pequeña variación en el ancho de semipico. En principio, la mejor opción era un tiempo de impulso bajo y un tiempo entre impulsos alto. Sin embargo, trabajando con el tiempo de impulso más bajo estudiado se incrementaba la corriente residual y la onda perdía reproducibilidad. Finalmente, en un compromiso entre sensibilidad y estabilidad, se optó por un tiempo de impulso de 0.04 s y un tiempo entre impulsos de 0.5 s.

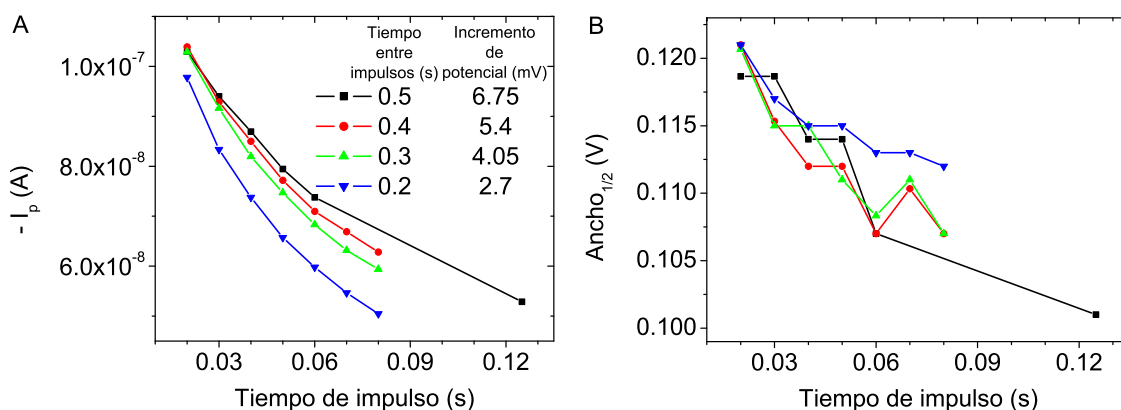


Figura 44. Intensidad de pico y ancho de semipico de pico de la onda 1 del ioxynil a concentración de constante de $10.1 \mu\text{M}$ frente al tiempo de impulso para distintos tiempos entre impulsos en voltamperometría diferencial de impulsos. En la gráfica A aparecen el tiempo entre impulsos (s) y el incremento de potencial (mV) usados, respectivamente. A: intensidad de pico. B: anchura de semipico. Electrolito: 0.5 M tampón fosfato pH=6.1.

IV. 2. 5. 2. Velocidad de barrido variando el incremento de potencial

En este apartado se realizaron medidas en las que se mantuvo fijo el tiempo entre impulsos y se varió el incremento de potencial, variando así la velocidad de barrido. En la Figura 45 se observa que cuanto mayor fuese la velocidad de barrido, se obtenía más intensidad de pico y menos anchura de semipico. Se eligió un incremento de potencial óptimo de 9 mV, que generaba una velocidad de barrido de 18 mV/s (tiempo entre impulsos de 0.5 s).

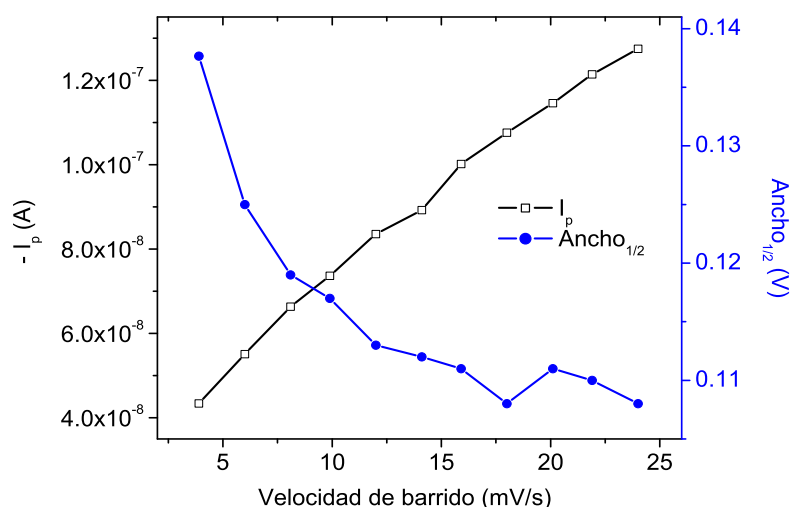


Figura 45. Intensidad de pico y ancho de semipico de la onda 1 del ioxynil a concentración de constante de $10.1 \mu\text{M}$ frente a la velocidad de barrido (variando el incremento de potencial) en voltamperometría diferencial de impulsos. Electrolito: 0.5 M tampón fosfato $\text{pH}=6.1$.

IV. 2. 5. 3. Estudio del mecanismo de llegada del 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo

Junto con los resultados obtenidos de dependencia del potencial de pico de la onda 1 del ioxynil con la velocidad de barrido mediante variación del incremento de potencial, se llevó a cabo la variación de la velocidad de barrido con el cambio en el tiempo entre impulsos a incremento de potencial constante. Los resultados permitieron conocer el mecanismo previo a la reducción del ioxynil: si este se encontraba adsorbido en la superficie del electrodo o llegaba por difusión. Dado que, tras realizar los ajustes de las representaciones del potencial de pico frente a la raíz y el logaritmo en base 10 de la velocidad de barrido con las dos formas de variar la velocidad de barrido, los datos se ajustaron en ambos casos mejor al logaritmo en base 10, podemos concluir que la reducción del ioxynil en ausencia de CB[6] ocurría previa adsorción de este en la superficie del electrodo de mercurio.

IV. 2. 5. 4. Amplitud

Como se observa en la Figura 46, se produjo un aumento de la intensidad de pico al aumentar la amplitud de impulso. La anchura de semipico se mantuvo prácticamente constante. Se escogió una amplitud de 80 mV .

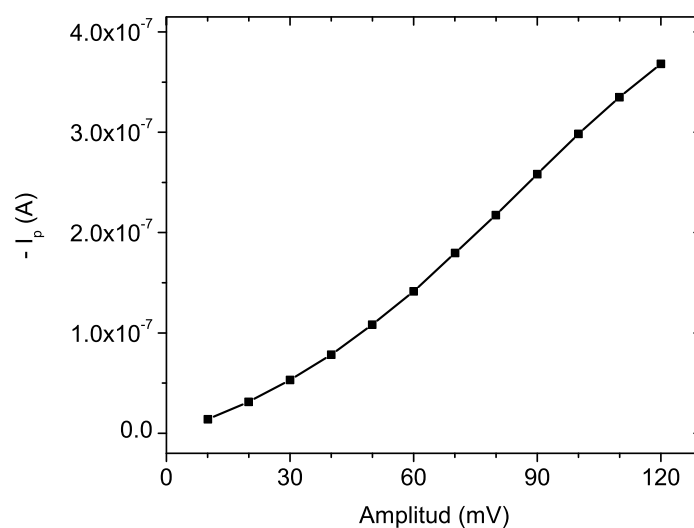


Figura 46. Intensidad de pico de la onda 1 del ioxynil a concentración de constante de 10.1 μM frente a la amplitud de impulso en voltamperometría diferencial de impulsos. Electrolito: 0.5 M tampón fosfato pH=6.1.

IV. 2. 5. 5. Potencial inicial

Tras la optimización de las variables instrumentales ya presentadas, se optimizó el potencial inicial. Se escogió el valor de -0.2 V aunque, como se muestra en la Figura 47, las variaciones en la señal entre el valor anteriormente usado de -0.1 V y el escogido de -0.2 V fueron muy pequeñas.

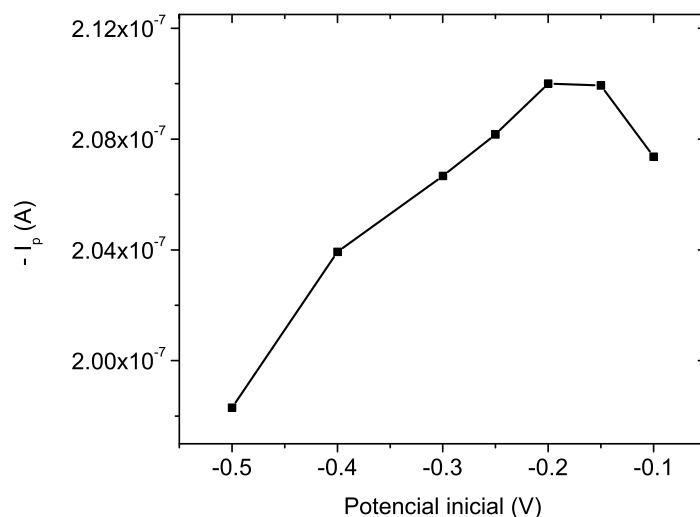


Figura 47. Intensidad de pico de la onda 1 del ioxynil a concentración de constante de 10.1 μM frente al potencial inicial en voltamperometría diferencial de impulsos. Electrolito: 0.5 M tampón fosfato pH=6.1.

IV. 2. 5. 6. Tiempo de equilibrio

Las variaciones fueron mínimas y se optó por un tiempo de equilibrio de 10 s.

IV. 2. 5. 7. Tiempo de deposición

Se dio la saturación de la señal al estudiar la dependencia entre la intensidad de pico de la onda 1 con el tiempo de deposición usando la concentración de analito con la que se optimizaron las variables instrumentales anteriormente presentadas. Por esto se decidió disminuir la concentración de analito. Se optó por trabajar con un tiempo de deposición de 300 s debido a los resultados obtenidos en la Figura 48.

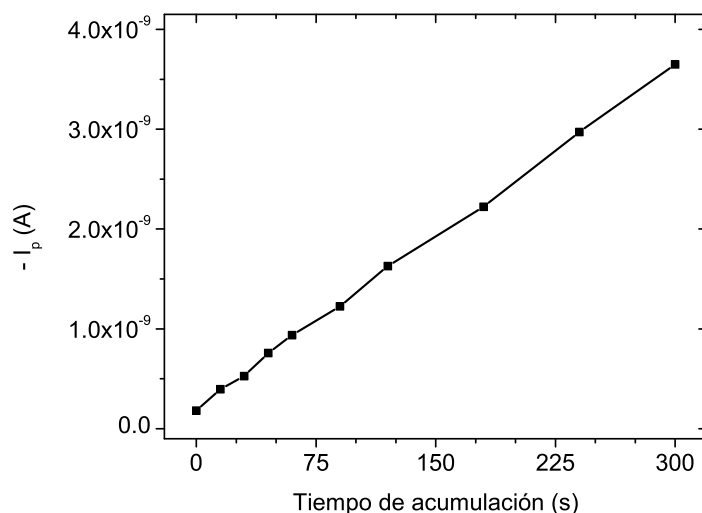


Figura 48. Intensidad de pico de la onda 1 del ioxynil a concentración de constante de 5.85 nM (2.17 ng/ml) frente al tiempo de acumulación en voltamperometría diferencial de impulsos. Electrolito: 0.5 M tampón fosfato pH=6.1.

IV. 2. 6. Optimización de las condiciones instrumentales en presencia de cucurbit[6]uril

Al igual que en la sección IV. 2. 5, tras optimizar las variables químicas que afectan a la detección electroquímica del ioxynil en presencia de CB[6], incluida la concentración de este, se estudiaron las condiciones instrumentales de la voltamperometría diferencial de impulsos con el fin de mejorar la señal analítica.

IV. 2. 6. 1. Potencial inicial

Como se muestra en Figura 49, cuanto menor fue el potencial inicial, mayor fue la intensidad de pico de la onda de interés (pico 1). Se decidió optimizar el resto de variables instrumentales con un potencial inicial de -0.1 V.

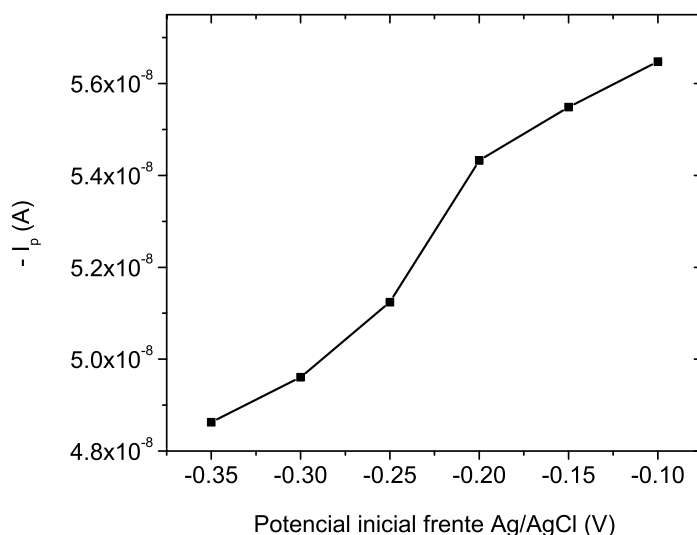


Figura 49. Intensidad de pico de la onda 1 del ioxynil en presencia de CB[6], a concentraciones de ioxynil y CB[6] de 10.0 y 20.0 μ M, respectivamente, frente al potencial inicial en voltamperometría diferencial de impulsos. Electrolito: 0.05 M tampón acético/acetato pH 4.2.

IV. 2. 6. 2. Tiempo entre impulsos y tiempo de impulso a velocidad de barrido constante

Como se mencionó en la sección IV. 2. 5. 1, la variación del tiempo entre impulsos ha de implicar la variación del incremento de potencial para obtener una velocidad de barrido constante. Al igual que en dicha sección, con un tiempo de impulso de 0.02 s la variabilidad en la onda y en la corriente residual eran altas. Como se ve en la Figura 50, para tiempos de impulso iguales o mayores de 0.05 s, la mayor intensidad fue para el tiempo entre impulsos de 0.5 s. No hubo cambios en la anchura de semipico. Se escogió un tiempo de impulso de 0.04 s y un tiempo entre impulsos de 0.5 s.

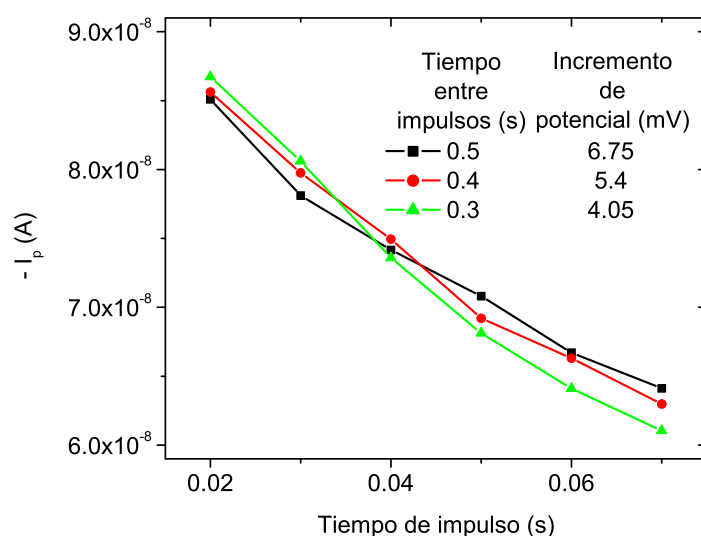


Figura 50. Intensidad de pico de la onda 1 del ioxynil en presencia de CB[6], a concentraciones de ioxynil y CB[6] de 10.0 y 20.0 μM , respectivamente, frente al tiempo de pulso para distintos tiempos entre impulsos en voltamperometría diferencial de impulsos. En la gráfica aparecen el tiempo entre impulsos (s) y el incremento de potencial (mV), respectivamente. Electrolito: 0.05 M tampón acético/acetato pH 4.2.

IV. 2. 6. 3. Velocidad de barrido variando el incremento de potencial

En la Figura 51 aparece la variación de la intensidad de pico de la onda 1 del ioxynil frente a la variación de la velocidad de barrido, variación realizada mediante cambios en el incremento de potencial, con el tiempo entre impulsos constante. Como se puede observar, cuanto mayor fue la velocidad, mayor fue la intensidad, sin que se produjesen variaciones en la anchura de semipico. Se optó por una velocidad de barrido de 18 mV/s, con un incremento de potencial de 9 mV (tiempo entre impulsos de 0.5 s).

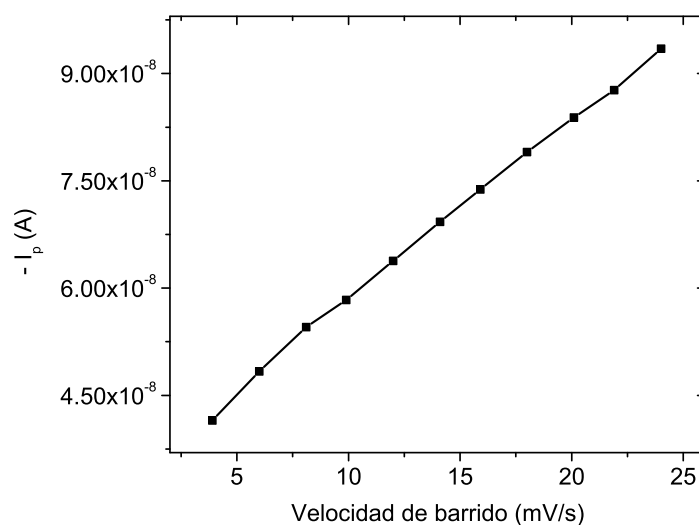


Figura 51. Intensidad de pico de la onda 1 del ioxynil en presencia de CB[6], a concentraciones de ioxynil y CB[6] de 10.0 y 20.0 μ M, respectivamente, frente a la velocidad de barrido (variando el incremento de potencial) en voltamperometría diferencial de impulsos. Electrolito: 0.05 M tampón acético/acetato pH 4.2.

IV. 2. 6. 4. Estudio del mecanismo de llegada del 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo en presencia de cucurbit[6]uril

Al igual que en la sección IV. 2. 5. 3, los resultados de dependencia del potencial de pico del ioxynil con la velocidad de barrido mediante variación del incremento de potencial permiten saber si el ioxynil y el CB[6] se encontraban adsorbidos en la superficie del electrodo o el analito llegaba al electrodo por difusión antes de reducirse. También se estudió dicha dependencia pero variando el tiempo entre impulsos a incremento de potencial constante. De nuevo, ya que tras realizar los ajustes de la representaciones del potencial de pico frente a la raíz y el logaritmo en base 10 de la velocidad de barrido con ambas maneras de variar la velocidad de barrido, los datos se ajustaron en ambos casos mejor al logaritmo en base 10, podemos concluir que la reducción del ioxynil en presencia de CB[6] ocurría previa adsorción del analito en la superficie del electrodo de mercurio con CB[6] adsorbido.

IV. 2. 6. 5. Amplitud

Como se muestra en la Figura 52, el aumento de este parámetro llevó a aumentos en la intensidad de pico del analito. El ancho de semipico no varió. Finalmente se optó por una amplitud de 80 mV.

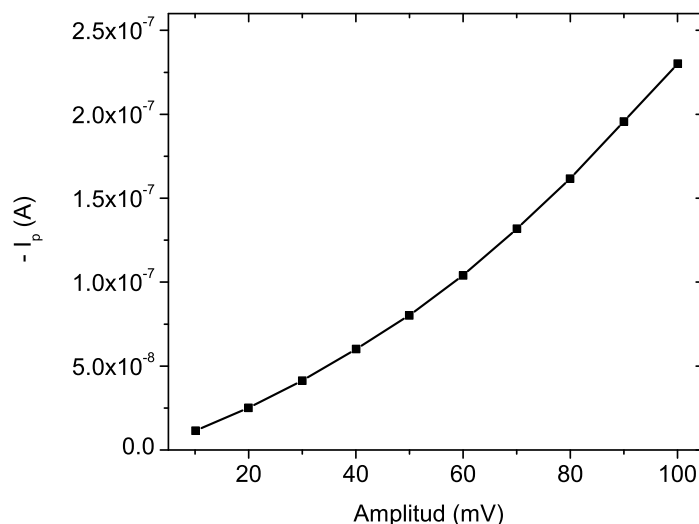


Figura 52. Intensidad de pico de la onda 1 del ioxynil en presencia de CB[6], a concentraciones de ioxynil y CB[6] de 10.0 y 20.0 μM , respectivamente, frente a la amplitud en voltamperometría diferencial de impulsos. Electrolito: 0.05 M tampón acético/acetato pH 4.2.

IV. 2. 7. Optimización de la concentración de cucurbit[6]uril

IV. 2. 7. 1. Concentración de cucurbit[6]uril

Tras optimizar las variables químicas e instrumentales para la determinación de ioxynil en presencia de CB[6], se decidió comprobar que la concentración considerada óptima de este (20.0 μM) para altas concentraciones de ioxynil (10-10.1 μM), también lo era para bajas concentraciones. Como se puede ver en las Figuras 53 y 54, este no fue el caso. Las diferencias con lo observado en las Figuras 40 y 41 pueden ser debidas a que para altas concentraciones el electrodo se encontraba saturado de analito. A una menor concentración de ioxynil fue necesario una mayor concentración de CB[6] para observar mejoras en la señal del analito. Así, la optimización del tiempo de deposición y del tiempo de equilibrio para baja concentración de analito se realizó con una concentración de CB[6] de 99.9 μM .

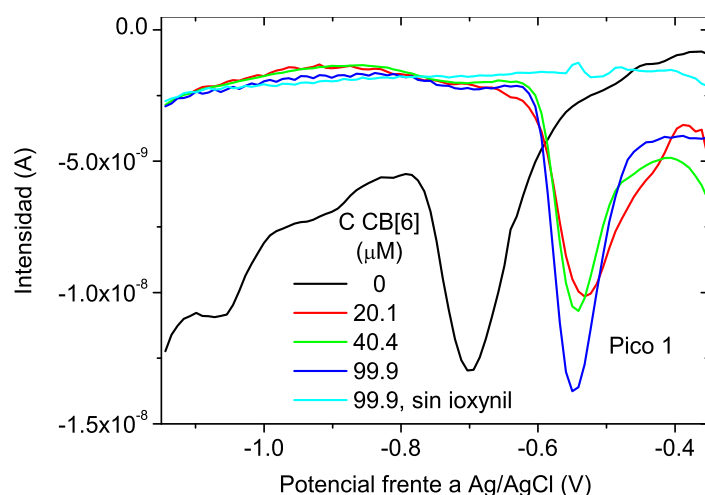


Figura 53. Voltamperogramas a concentración constante de ioxynil ($0.398 \mu\text{M}$, 148 ng/ml) y variable de CB[6] en voltamperometría diferencial de impulsos. En la gráfica se indica la concentración de CB[6] (μM). Electrolito: 0.05 M tampón acético/acetato pH 4.2.

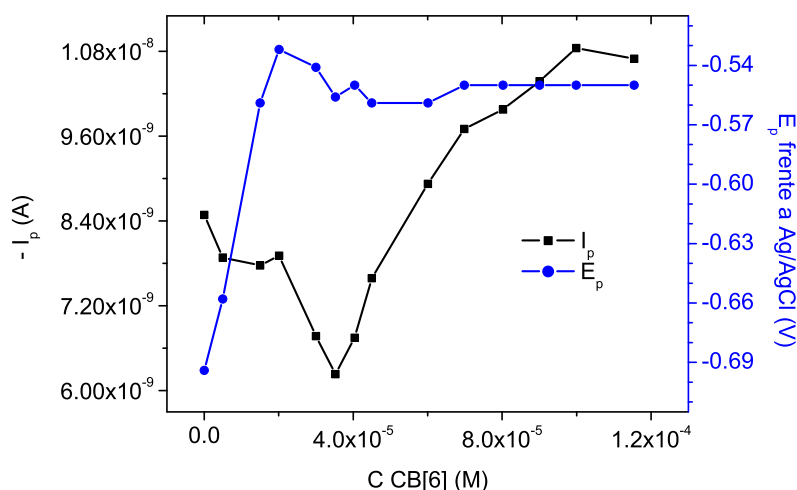


Figura 54. Intensidad y potencial de pico de la onda 1 a concentración constante de ioxynil ($0.398 \mu\text{M}$, 148 ng/ml) frente a la concentración de CB[6] en voltamperometría diferencial de impulsos. Electrolito: 0.05 M tampón acético/acetato pH 4.2.

IV. 2. 7. 2. Tiempo de deposición y tiempo de equilibrio

Con la concentración de ioxynil más baja y una nueva concentración de CB[6] óptima se estudió la dependencia entre la señal del analito con el tiempo de deposición. Se obtuvo una mayor intensidad de pico al aumentar el tiempo de acumulación como se puede observar en la Figura 55. Se consideró un valor óptimo de 300 s . La intensidad de pico

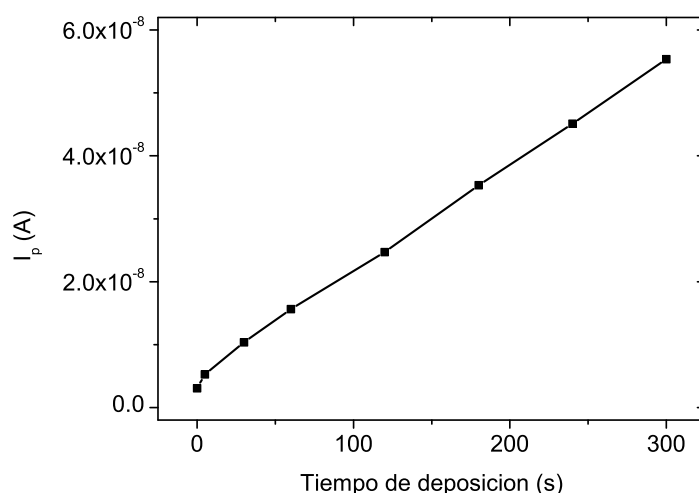


Figura 55. Intensidad de pico de la onda 1 del ioxynil en presencia de CB[6], a concentraciones de ioxynil y CB[6] de 0.149 μ M (55.1 ng/ml) y 99.9 μ M, respectivamente, frente al tiempo de deposición en voltamperometría diferencial de impulsos. Electrolito: 0.05 M tampón acético/acetato pH 4.2.

aumentó ligeramente con un tiempo de equilibrio de 10 s respecto al anteriormente usado de 5 s, valor de 10 s que se consideró óptimo.

IV. 2. 8. Influencia de la concentración de 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo

Se calibró el método para la determinación de ioxynil en ausencia de CB[6] tras la optimización de las condiciones químicas e instrumentales (ver Figura 56). La relación entre la intensidad de pico del ioxynil y la concentración del analito fue lineal en el rango de 2.35 a 22.0 ng/ml con una ecuación de recta de I_p (A) = $1.07 \cdot 10^{-9}$ C (ng/ml) + $9.86 \cdot 10^{-10}$, $R^2=0.9990$. El límite de cuantificación, determinado como 10 veces la desviación estándar, fue de 2.35 ng/ml y el error relativo y la desviación estándar relativa fueron inferiores al 7% (n=5).

IV. 2. 8. 1. En presencia de cucurbit[6]uril

Se calibró el método para la determinación de ioxynil en presencia de 101 μ M CB[6] tras la optimización de las condiciones químicas e instrumentales, voltamperogramas y recta de calibrado que aparecen en la Figura 57. La relación entre la intensidad de pico del ioxynil y la concentración del analito fue lineal en el rango de 6.46

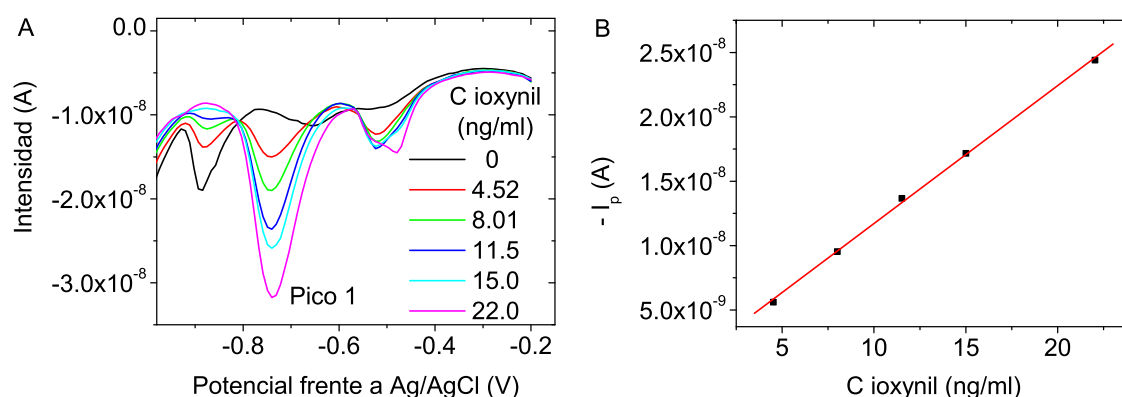


Figura 56. Voltamperogramas a concentración variable de ioxynil e intensidad de pico de la onda 1 del ioxynil frente a la concentración de este en voltamperometría diferencial de impulsos. A: voltamperogramas, aparece en la gráfica la concentración de ioxynil (ng/ml); B: intensidad de pico de la onda 1. Electrolito: 0.5 M tampón fosfato pH=6.1.

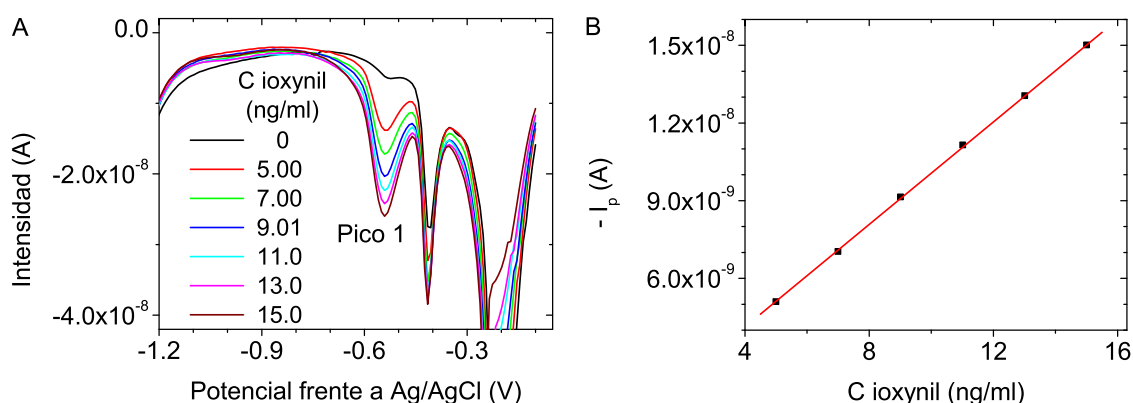


Figura 57. Voltamperogramas a concentración variable de ioxynil e intensidad de pico de la onda 1 del ioxynil frente a la concentración de este a concentración constante de CB[6] de 101 μ M en voltamperometría diferencial de impulsos. A: voltamperogramas, aparece en la gráfica la concentración de ioxynil (ng/ml); B: intensidad de pico de la onda 1. Electrolito: 0.05 M tampón acético/acetato pH 4.2.

a 15.0 ng/ml con una ecuación de recta de I_p (A) = 9.94×10^{-10} C (ng/ml) + 1.44×10^{-10} , $R^2=0.9998$. El límite de cuantificación, determinado como 10 veces la desviación estándar, fue de 6.46 ng/ml y el error relativo y la desviación estándar relativa fueron inferiores al 10% (n=5).

IV. 2. 9. Aplicación analítica para la detección de 3,5-iodo-4-hidroxibenzonitrilo

La determinación del analito en agua potable dopada con 220 ng/ml generó una señal de $-1.01 \cdot 10^{-8}$ A de intensidad de pico. Mediante interpolación, la recuperación fue del 100% con un error relativo y una desviación estándar relativa inferiores al 3% (n=5).

IV. 2. 9. 1. En presencia de cucurbit[6]uril

La determinación del analito en agua potable dopada con 220 ng/ml generó una señal de $-7.24 \cdot 10^{-9}$ A de intensidad de pico. Mediante interpolación, la recuperación fue del 87% con un error relativo y una desviación estándar relativa inferiores al 12% (n=5).

IV. 3. ADSORCIÓN DE CUCURBIT[6]URIL Y CUCURBIT[7]URIL EN ORO

La adsorción de diferentes CB[n] sobre superficies de oro ya ha sido reportada y consiste en la simple inmersión de sustratos o electrodos de oro en disoluciones saturadas de CB[6] o CB[8] o en disolución 0.1 mM de CB[7] durante 24 horas. La adsorción viene mediada por enlaces de los oxígenos carbonílicos de una de las entradas a la cavidad con el oro [85]. Esta estrategia ha permitido la inmovilización de la proteína fluorescente amarilla, modificada expresamente para que se una al CB[7] adsorbido previamente [55].

IV. 3. 1. Adsorción a partir de disolución de cucurbit[6]uril en 0.1 M sulfato sódico

Como se hizo referencia en la sección I. 1, una de las características más notables del CB[6] es su baja solubilidad en agua que aumenta considerablemente si en la disolución hay iones de metales alcalinos o alcalino-térreos. Con el objetivo de que dicha adsorción se produjese de manera más rápida, se empleó CB[6] 2.90 mM en 0.1 M sulfato sódico. Dicho cambio en la metodología debía ser comprobado.

En las imágenes de la Figura 58 aparecen las imágenes topográficas de sustratos de oro con CB[6] adsorbido durante distintos tiempos de permanencia en disolución de CB[6]. Para el tiempo más bajo de adsorción (5 minutos, Figura 58A) se observan partículas independientes que presentaban tendencia a agregar. Para 15 minutos (Figura 58B) las moléculas de CB[6] tendieron a ocupar la superficie sin cubrir entre partículas previamente adsorbidas, haciendo más evidentes los huecos y reduciendo el diámetro de estos. Se midió la altura de las partículas de CB[6] para estos bajos tiempos de deposición, alturas que aparecen en el histograma de la Figura 59. La distribución poblacional se ajustó a una distribución normal, ecuación que aparece en [3] (obtenida de [130]), en la que

$$Frecuencia(Altura) = Base + \frac{Frecuencia_{\max}}{\sigma \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(Altura - \overline{Altura})^2}{2\sigma^2}\right) \quad [3]$$

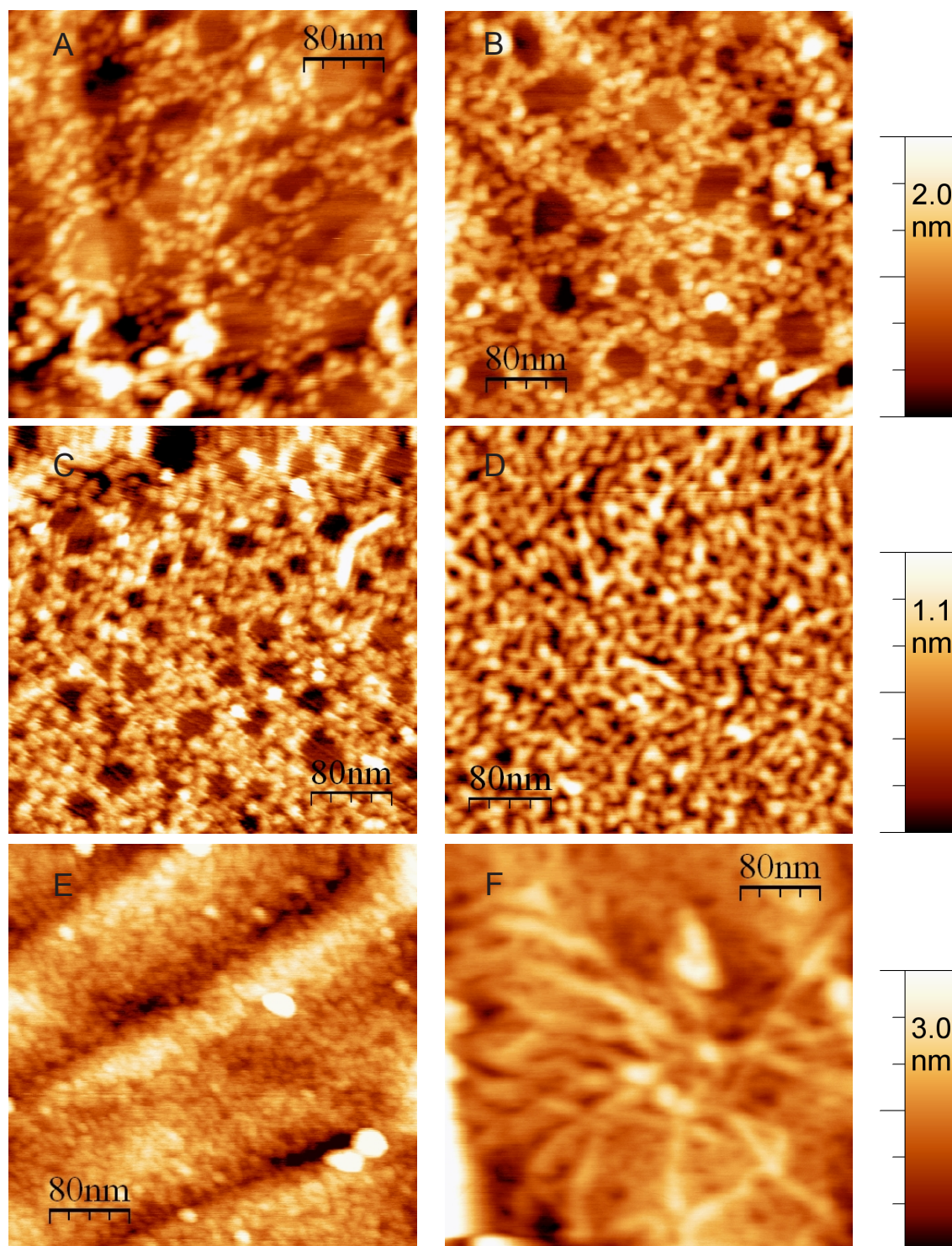


Figura 58. Imágenes topográficas del CB[6] adsorbido sobre oro a partir de disolución de 2.90 mM CB[6] en 0.1 M sulfato sódico. A: 5 min; B: 15 min; C: 1 hora; D: 2 horas; E: 4 horas; F: 10 horas. A la derecha de cada par de imágenes aparece la escala de color asociada con su altura (nm).

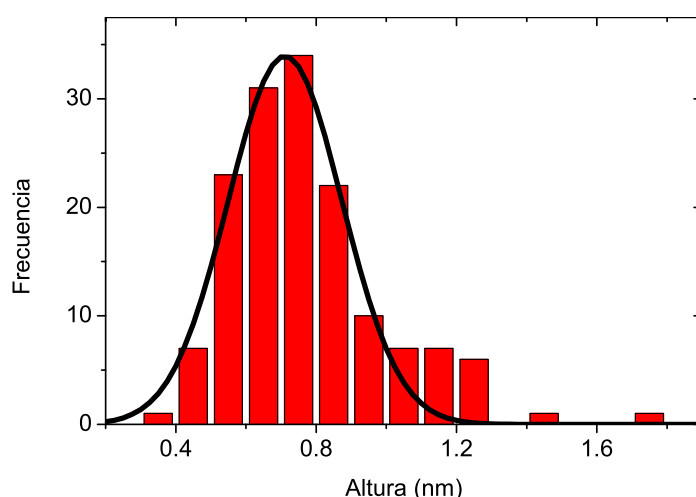


Figura 59. Histograma de la altura de partículas de CB[6] ($n=150$) para adsorción de CB[6] sobre oro durante 5-30 minutos a partir de disolución de 2.90 mM CB[6] en 0.1 M sulfato sódico y ajuste de los datos a una distribución normal.

únicamente se impuso que el valor de la base fuese de 0 y que resultó en un valor medio de 0.71 ± 0.16 nm ($\pm 1\sigma$). Las diferencias existentes entre el valor de referencia de 0.91 nm para la altura de las moléculas de CB[n] [4] y el valor presentando se deben a que el valor de referencia se obtuvo por cristalografía de rayos X. La interacción que se da entre moléculas adyacentes en el caso del cristal es distinta de la que se da en la adsorción sobre sólidos. Se produjo en nuestro caso una contracción de los oxígenos que estaban en contacto con la superficie. Estas pequeñas diferencias también se han observado en otros sistemas como el grafeno [131].

Para 1 hora de adsorción los huecos entre la capa de CB[6] adsorbido se hicieron aún más pequeños (Figura 58C). Las imágenes de las Figuras 58D y 58E fueron obtenidas para 2 y 4 horas de acumulación, respectivamente, y se observa que la superficie de oro sin recubrir ya no era evidente pero no se generó una superficie homogénea por lo que había defectos en la capa. Los defectos se hicieron más claros y surgieron polímeros lineales tras 10 horas de deposición (Figura 58F). En la Figura 60 aparecen representaciones de las estructuras encontradas de la adsorción del CB[6] en estas condiciones.

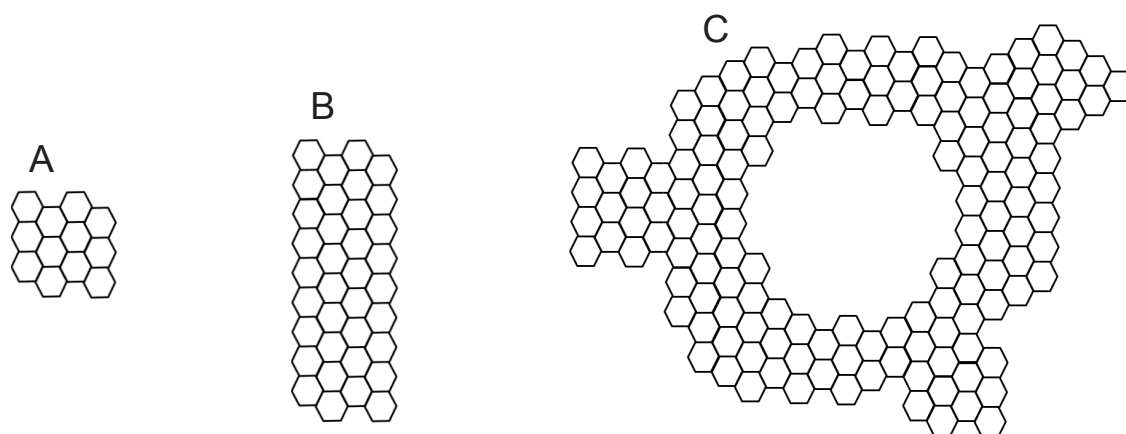


Figura 60. Representación idealizada de algunas de las estructuras encontradas del CB[6] adsorbido en oro partiendo de su disolución en 0.1 M sulfato sódico. A: partículas independientes; B: polímeros; C: huecos.

A pesar de los bajos tiempos de adsorción, vemos en el histograma de la Figura 59 que había una pequeña población de partículas (menos del 2% respecto al total) cuyas alturas se encontraban fuera del ajuste y al menos duplicaban el valor de 0.71 nm. Esto era indicativo de que en estas condiciones se daba la superposición de partículas de CB[6], unas encima de otras previamente adsorbidas. Esto se demostró en experimentos de retirada de material de la superficie. Como se puede observar en la Figura 61, se obtienen perfiles con alturas que van desde 0.5 a 2.5 nm, sin considerar la altura del material acumulado que se produce en algunos de los laterales de la oquedad realizada. Así, la deposición de CB[6] con disolución de este en 0.1 M sulfato sódico llevó a la formación de multicapas y no se puede aplicar en la modificación de electrodos de oro con fines electroanalíticos. Sin embargo, si podría tener aplicación en nanotecnología por la formación de polímeros.

El uso de técnicas electroquímicas permitió corroborar lo observado. La oxidación de electrodos de oro es una metodología que se ha empleado para el estudio de la modificación de electrodos de oro con alcanotioles de distinta longitud [122]. Como se muestra en la Figura 62, con el electrodo modificado se produjo un descenso en la intensidad de pico (45% inferior), pero no la total desaparición debido probablemente a la

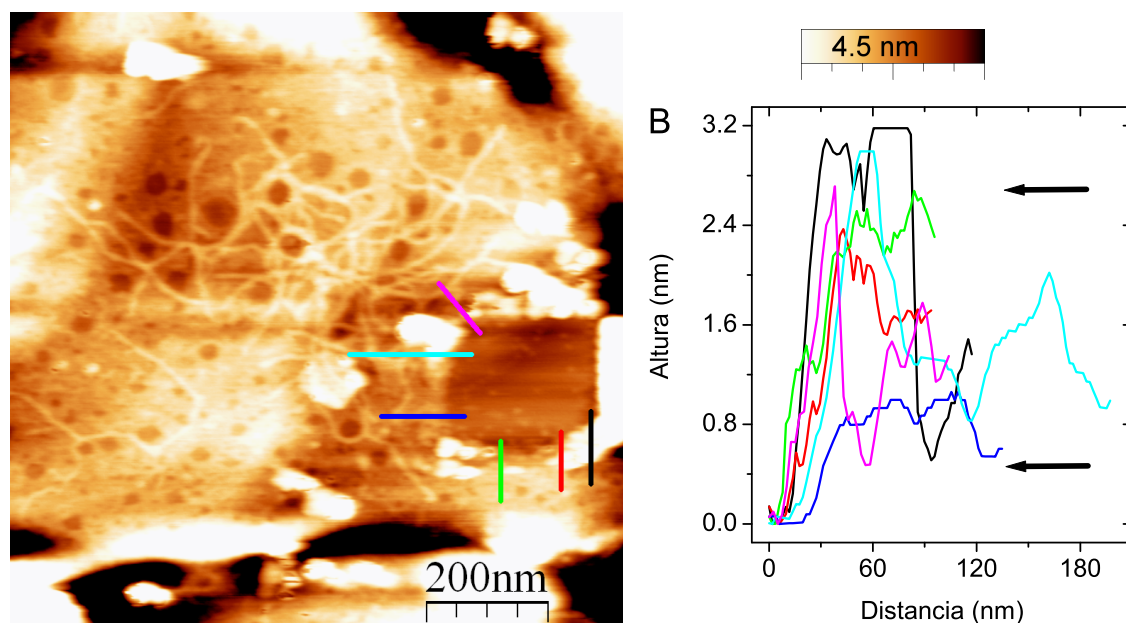


Figura 61. Imagen topográfica y perfiles tras la retirada de material de la superficie tras 4 horas de adsorción en 2.90 mM CB[6] en 0.1 M sulfato sódico. A: imagen topográfica; B: perfiles realizados en A representados con el mismo color.

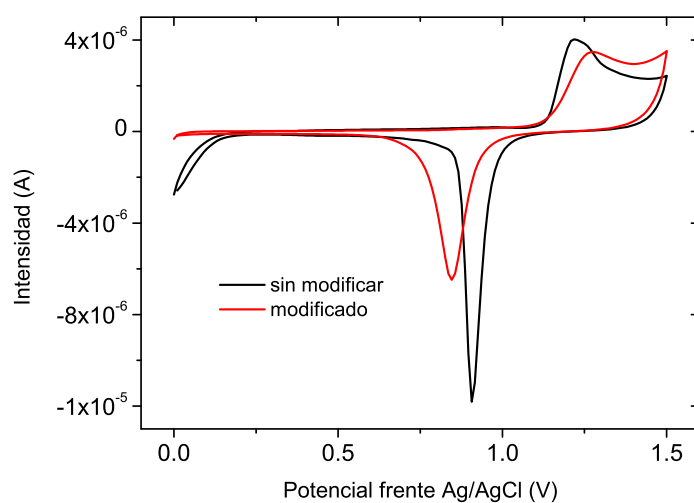


Figura 62. Voltamperogramas de voltamperometría cíclica a 100 mV/s de electrodo de oro sin modificar y modificado durante 4 horas en 2.90 mM CB[6] en 0.1 M sulfato sódico. Electrolito: 0.1 M ácido sulfúrico.

existencia de defectos [85-86]. La posterior reducción de los óxidos de oro generados fue más difícil termodinámicamente (desplazamiento del potencial de pico de 60 mV) que con el electrodo sin modificar.

La modificación del electrodo también se estudió usando como sonda el sistema hidroquinona/quinona. Como se puede observar en la Figura 63, la modificación del electrodo durante 5 horas y sin agitar la disolución en presencia del electrodo llevó a la disminución de la señal de la hidroquinona libre y a la aparición de una onda en el barrido anódico a un potencial más alto mientras que el barrido catódico solo se observó una onda a un potencial más bajo. Este comportamiento de pérdida de reversibilidad de la sonda ya se ha observado en electrodos de oro modificados con alcanotioles, que generan una superficie hidrofóbica [122]. Así, la hidroquinona podría haberse introducido en la cavidad del CB[6] o en los defectos existentes en la capa. Para descartar la primera posibilidad se usó la isobutilamina que forma un complejo de inclusión de alta afinidad con el CB[6] a pH ácido. No se usó la 1,5-pentanodiamina ya que podría conllevar el descenso en la afinidad o incluso la no formación del complejo pues esta amina interacciona con ambas entradas y los grupos carbonílicos de una de las entradas ya se encontraba interaccionando con la superficie de oro. Para que se diese la formación del complejo [CB[6]-isobutilamonio]⁺ en la superficie del electrodo se decidió agitar la disolución, pero esto podría implicar la desorción de la capa de CB[6] previamente adsorbida, siendo la otra excepción en la que la medida no se realizó justo después de la preparación de la disolución

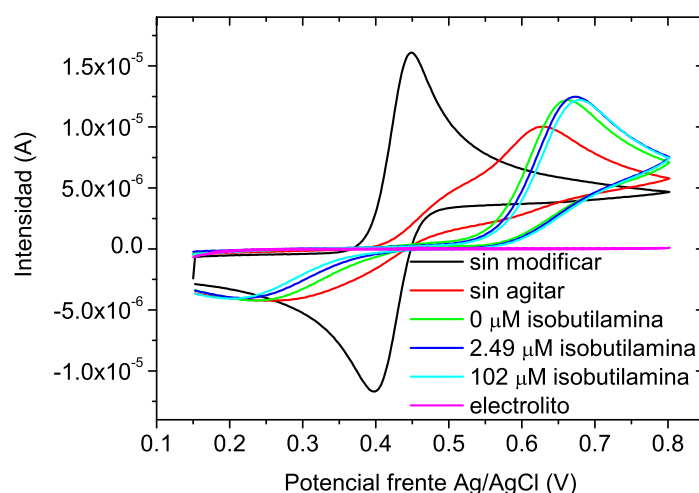


Figura 63. Voltamperogramas a concentración constante de hidroquinona de 1.04 mM en voltamperometría cíclica a 100 mV/s con electrodo de oro modificado durante 5 h con 2.90 mM CB[6] en 0.1 M sulfato sódico. En la gráfica aparece la concentración de isobutilamina (μM) tras agitar la disolución en presencia del electrodo modificado. Electrolito: 0.1 M ácido sulfúrico.

de medida (ver III. 5 y IV. 1. 2. 1). Así, antes de medir la disolución de hidroquinona en presencia de isobutilamina, se agitó durante 5 minutos la disolución de hidroquinona con el electrodo modificado inmerso y antes de la medida para comprobar la estabilidad de la capa de CB[6]. Como se puede observar en la Figura 63 en ausencia de isobutilamina en la disolución de medida, la agitación no llevó al aumento de la señal de la hidroquinona libre en cada barrido por lo que la capa adsorbida de CB[6] no se alteró con la agitación. Por último, vemos que la presencia de isobutilamina tampoco conllevó al aumento de la señal de la hidroquinona libre por lo que la hidroquinona y el CB[6] no formaron un complejo de inclusión. Esto no nos sorprendió ya que el CB[6] forma complejos de inclusión de relativa afinidad con derivados de benceno si contienen como sustituyente del anillo al menos un grupo amina o metilamina, constante de formación que en estos casos es un orden de magnitud inferior que la del complejo con isobutilamina [18].

Al agitar sin o con isobutilamina, no solo no se recuperó la señal de la hidroquinona libre, sino que el sistema se hizo todavía más irreversible. Esto era indicativo de que la hidroquinona se vio forzada a difundir en los defectos existentes en la capa de CB[6] entre moléculas adyacentes, superficies de contacto que eran hidrofóbicas. Tras añadir isobutilamina y agitar posteriormente, el comportamiento de la sonda se hacía cada vez más irreversible, aunque ligeramente en comparación con la primera agitación, indicando que con la primera agitación casi todos los defectos fueron ocupados por la sonda.

El comportamiento observado en la Figura 63 con 5 horas de adsorción no fue exclusivo de ese tiempo de modificación. Como vemos en las gráficas de la Figura 64, la agitación de la disolución de la sonda en presencia del electrodo modificado llevó también al aumento de la irreversibilidad del sistema. Este hecho también se observó al permanecer en contacto electrodo y disolución de hidroquinona sin agitación pero de manera mucho más lenta. La observación de la onda de oxidación de la hidroquinona libre tras agitar indicaba que había zonas en el electrodo sin recubrir con defectos suficientemente grandes como para que la hidroquinona no se acumulase en ellos. Entre 1 y 5 h de deposición

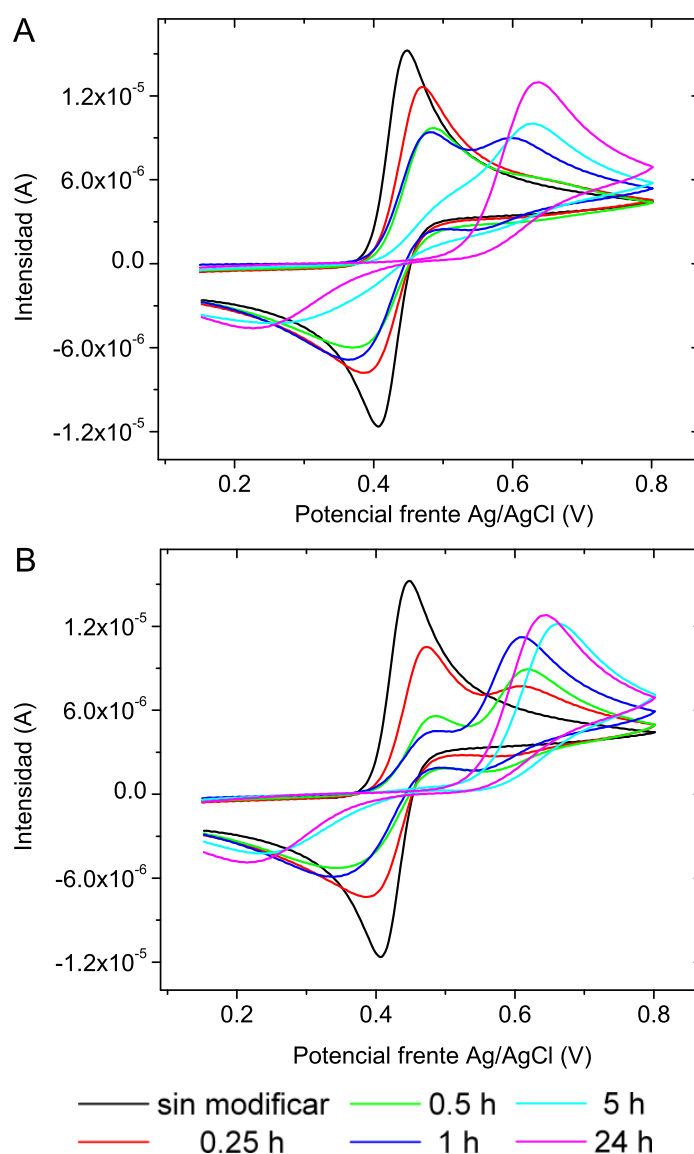


Figura 64. Voltamperogramas a concentración constante de hidroquinona 1.04 mM en voltamperometría cíclica a 100 mV/s. En la parte inferior de las gráficas aparece el tiempo (horas) de modificación del electrodo de oro con 2.90 mM CB[6] en 0.1 M sulfato sódico. A: sin haber agitado la disolución de hidroquinona en presencia del electrodo; B: tras agitar. Electrolito: 0.1 M ácido sulfúrico.

dichas áreas desnudas desaparecieron mientras que con 2 horas de adsorción no se observaron claramente huecos de superficie de oro desnuda en la Figura 58D.

Se realizó otro estudio para confirmar que la hidroquinona se introducía en los defectos existentes en la capa de CB[6]. Tras la adsorción de CB[6] durante 1 día y después

de realizar las medidas con 1 mM hidroquinona, el electrodo se lavó con agua y se sumergió en la celda conteniendo solo electrolito. Como se puede observar en la Figura 65, tras lavar se seguía observando la señal de la hidroquinona, indicando que esta se encontraba adsorbida junto con el CB[6] adsorbido previamente. Sin embargo, la realización de la primera medida, implicando la oxidación de la hidroquinona y posterior reducción de la quinona llevó a la casi total desorción de las moléculas acumuladas en los defectos.

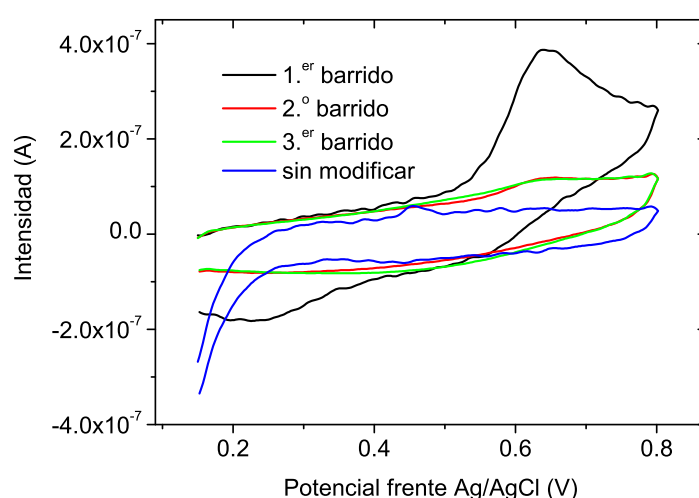


Figura 65. Voltamperogramas en voltamperometría cíclica a 100 mV/s en electrolito soporte (sin hidroquinona) con electrodo de oro modificado con 2.90 mM CB[6] en 0.1 M sulfato sódico durante 24 horas y tras la realización de medidas en 1.04 mM hidroquinona y lavado del electrodo con agua. En la gráfica se indica el barrido tras la inmersión del electrodo en el electrolito. Electrolito: 0.1 M ácido sulfúrico.

IV. 3. 2. Adsorción a partir de disolución de cucurbit[6]uril saturada

También se monitorizó mediante microscopia de fuerzas atómicas la deposición del CB[6] mediante disolución saturada de este en agua a distintos tiempos de permanencia del sustrato. Mayor cantidad de CB[6] se depositó cuanto mayor fue el tiempo de acumulación como se observa en la Figura 66, al igual que con el uso de la disolución en 0.1 M sulfato sódico. Fue de destacar que el recubrimiento que se obtuvo fue muy similar al que se mostró en las Figuras 58C y 58E, con los mismos tiempos de adsorción. Esto indicaba que aunque la concentración de CB[6] en la disolución saturada en agua fuese mucho menor

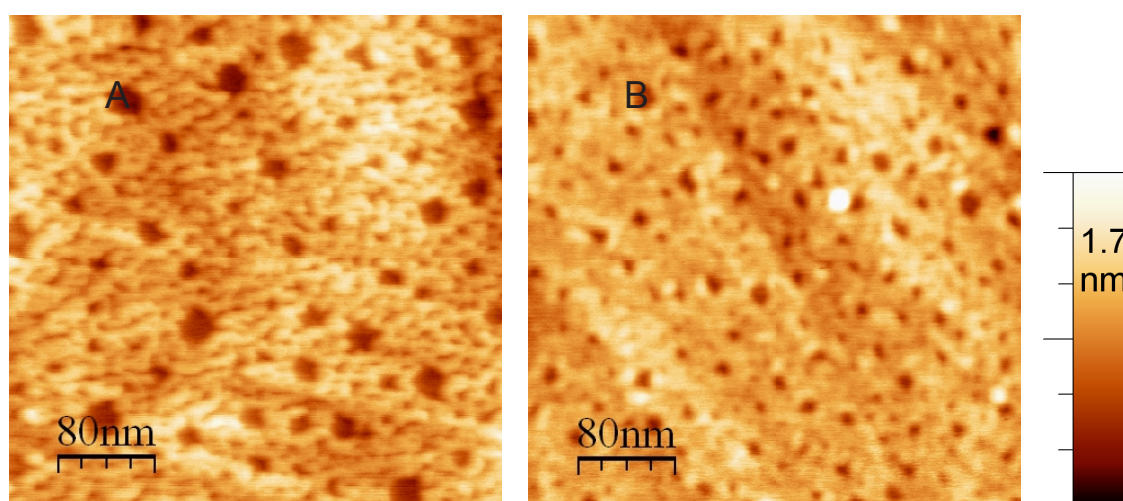
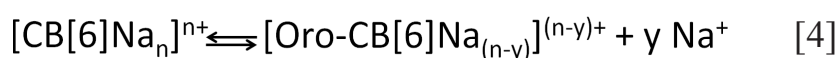


Figura 66. Imágenes topográficas del CB[6] adsorbido sobre oro a partir de disolución de CB[6] saturada en agua. A: 1 hora; B: 4 horas.

(más de 100 veces inferior) [25-28], los cationes unidos al CB[6] en disolución de sulfato sódico juegan un papel contraproducente en la adsorción. Como queda esquematizado en [4], la adsorción del CB[6] a partir de su disolución con sales implicaba que:

1) Hubiese menos grupos carbonílicos disponibles para que se diese la adsorción si se considera que solo una de las entradas a la cavidad no presenta ningún ión sodio unido.

2) O que la liberación de ión sodio de la entrada a la cavidad por la que se iba a producir la unión a la superficie si se establece que el CB[6] presenta en disolución ambos conjuntos de grupos carbonílicos unidos a iones sodio.



Respecto al uso de disolución saturada, en el primer caso se disminuía la probabilidad para que se diese el evento de adsorción ya que la población de cavidades libres se disminuía a la mitad. Con la segunda posibilidad, el CB[6] presenta afinidad por cationes inorgánicos que implica que la liberación del catión fuese costosa en términos termodinámicos y también cinéticos ya que antes de la reacción de adsorción se añadía una etapa más.

La imagen topográfica y perfiles realizados tras la retirada física de material de la superficie mediante el microscopio aparecen en la Figura 67. Como se puede observar y a diferencia del uso de CB[6] en 0.1 M sulfato sódico (Figura 61), los perfiles realizados indican alturas de capa de CB[6] de entre 0.3 y 1.1 nm. Ya que estos márgenes se encuentran dentro de los límites de altura de partículas de CB[6] sin superposición de estas (Figura 59), bajo estas condiciones de acumulación se generaron monocapas. Este procedimiento de modificación de superficies de oro si sería apto para su aplicación en electroanálisis.

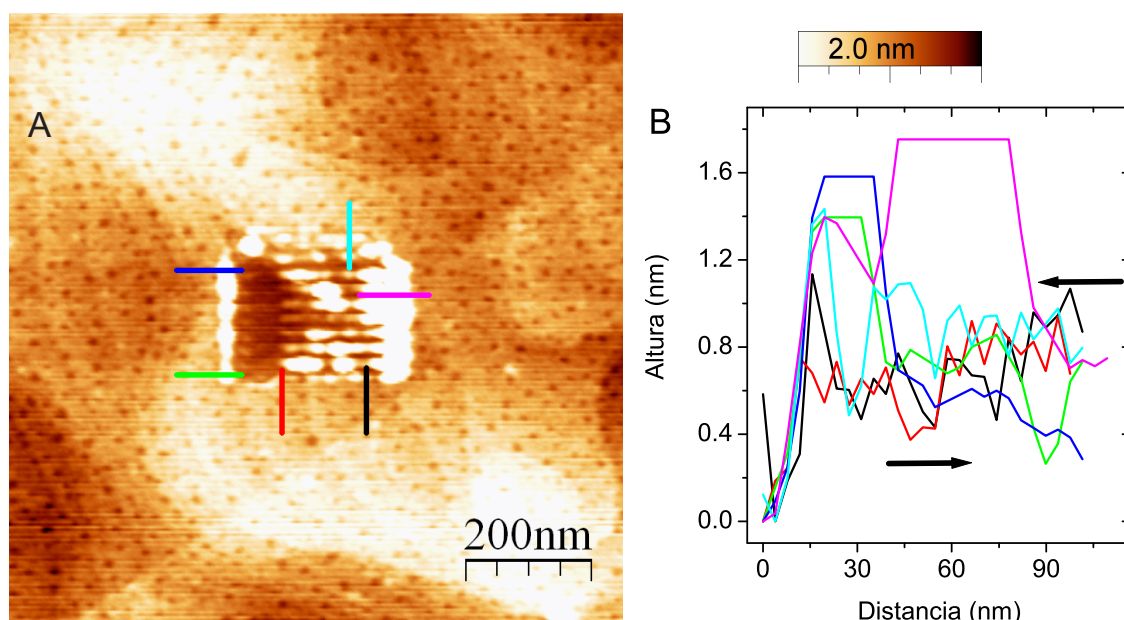


Figura 67. Imagen topográfica y perfiles tras la retirada de material de la superficie tras 4 horas de adsorción en disolución de CB[6] saturada en agua. A: imagen topográfica; B: perfiles realizados en A representados con el mismo color.

Dado que se formaron monocapas y no se produjo la formación de polímeros, a diferencia de lo observado cuando se usó disolución de CB[6] en 0.1 M sulfato sódico, se concluye que los iones sodio añadían otras dos características en la adsorción de CB[6] en oro, aparte de la ya comentada de ralentización de la adsorción:

- 1) Indujeron la agregación de partículas de CB[6] unas encima de otras.
- 2) Generaron polímeros lineales.

La adsorción de los cucurbit[n]uriles en oro se produce a través del grupo de los oxígenos carbonílicos presentes en uno de los lados con la superficie [85]. Dado que en los dos casos estudiados de adsorción de CB[6] las moléculas no tendieron a estar dispersas al azar, son de destacar las uniones que se daban entre moléculas adyacentes por interacción de las superficies externas entre las dos entradas a la cavidad, superficie que aparece resaltada en gris en la Figura 68, superficie que es hidrofóbica según los resultados expuestos anteriormente. En el caso de la adsorción en presencia de iones sodio, entran en juego nuevas interacciones. En estado sólido se ha caracterizado al CB[6] unido a distintos iones alcalinos, formando estructuras poliméricas en las que los iones actúan como puente entre unidades de CB[6] en el caso de los iones potasio y rubidio [35,36], aunque con el sodio y el cesio se observaron los complejos independientes [31,37].

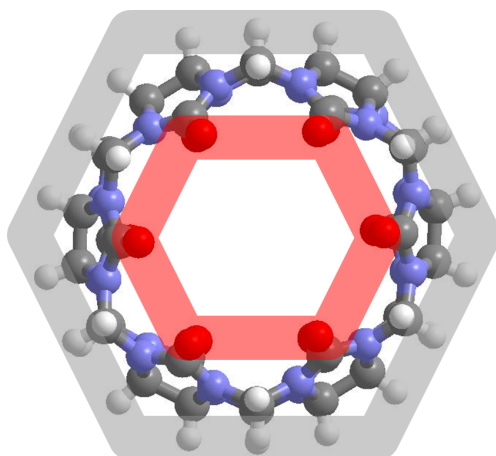


Figura 68. Representación esquemática del CB[6] basándose en la estructura cristalográfica de este [33].

La adsorción de CB[6] sobre la capa de CB[6] previamente adsorbida en ausencia de cationes sodio no fue posible debido a la repulsión que se generaría entre grupos carbonílicos enfrentados de moléculas de CB[6] adyacentes. Sin embargo, en presencia de iones sodio lo que ocurrió fue la inversión de la polaridad de la superficie generando una cargada positivamente, hecho que permite la adsorción del polímero cargado negativamente del ácido desoxirribonucleico en superficies de mica (de igual carga) en

presencia de cationes metálicos [132]. En estas condiciones ya se pudo dar la formación de multicapas por las nuevas interacciones ión-dipolo actuando en sentido vertical a la superficie como a la generación de polímeros (en paralelo a la superficie) como se esquematiza en la Figura 69.

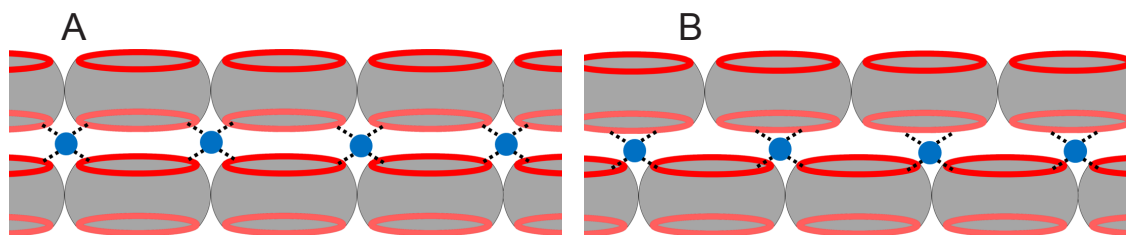


Figura 69. Representación esquemática de la superposición de CB[6], en presencia de sodio. A: con las cavidades alineadas; B: con desplazamiento.

IV. 3. 3. Adsorción a partir de disolución de cucurbit[7]uril

Al igual que en las secciones IV. 3. 1 y IV. 3. 2, este proceso de adsorción no ha sido previamente monitorizado mediante microscopía de fuerzas atómicas, aunque si para el estadio final con CB[7], tras 24 horas de adsorción a partir de disolución 0.1 mM de CB[7] en agua [86].

La adsorción del CB[7] para bajos tiempos de permanencia en disolución fue sustancialmente distinta respecto a la vista con el CB[6] a partir de disolución de este en 0.1 M sulfato sódico (Figura 58) o saturada en agua (Figura 68). Como se muestra en las Figuras 70A, 70B y 70C, para 10, 30 y 60 minutos, respectivamente, la superficie no presentó ni huecos ni partículas definidos lo cual no fue debido a daños en la punta de los chips usados en las medidas. Para el último tiempo de adsorción mencionado también se hicieron estudios de retirada de material con el CB[7]. Como se puede ver en la Figura 71, los cúmulos de material para bajos tiempos de deposición correspondieron a monocapas de CB[7] ya que la altura de la capa se encuentra entre 0.5 y 1.2 nm, dentro de los márgenes para partículas sin superponer del CB[6] que se muestran en la Figura 59, pudiendo hacer dicha comparación ya que el CB[6] y el CB[7] presentan una altura común de 0.91 nm [5].

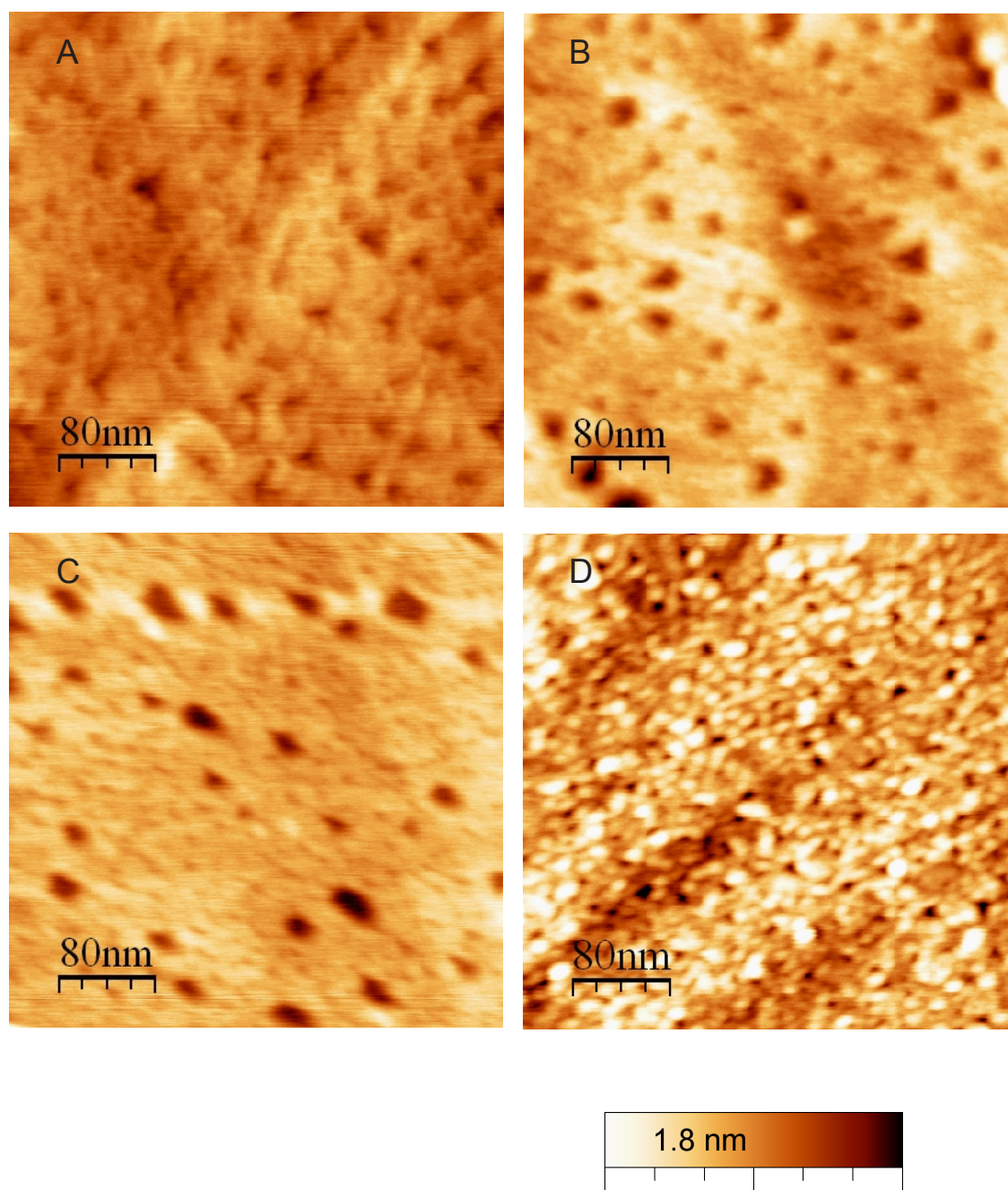


Figura 70. Imágenes topográficas del CB[7] adsorbido sobre oro a partir de disolución 1.02 mM CB[7]. A: 10 min; B: 30 min; C: 1 hora; D: 4 horas. En la parte inferior aparece la escala de color asociada de todas las imágenes (nm).

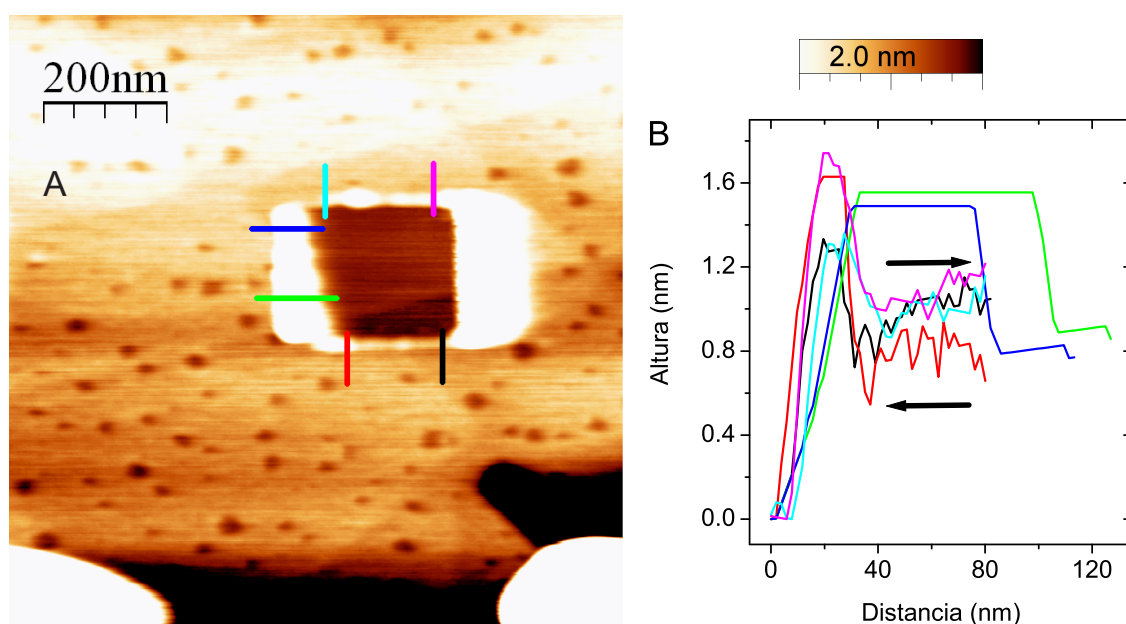


Figura 71. Imagen topográfica y perfiles tras la retirada de material de la superficie tras 1 hora de adsorción en disolución de 1.02 mM CB[7]. A: imagen topográfica; B: perfiles realizados en A representados con el mismo color.

Así, en estas condiciones, la adsorción del CB[7] fue mucho más rápida que la de CB[6]. Dos explicaciones a esto son razonables:

- 1) El CB[7] presenta una alta solubilidad en ausencia de sales. En el caso del CB[6], la presencia de sales ralentizó el proceso de adsorción y se obtuvieron concentraciones de adsorbato similares a las del CB[6] en presencia de sales.
- 2) El CB[7] presenta por cada entrada a la cavidad un grupo carbonílico más respecto al CB[6], oxígenos de grupos carbonílicos que son los responsables de la unión a la superficie de oro. Esto provocó una mayor afinidad hacia el sustrato respecto al CB[6].

Para 4 horas de adsorción se observa que la superficie no presentaba grandes huecos y había agregados de partículas (Figura 70D). Había multicapas según los resultados de los experimentos de retirada de material. Como se puede ver en la Figura 72, la capa presentaba alturas de entre 1.0 y 3.0 nm. Por lo tanto, la modificación de electrodos de oro con CB[7] con fines electroanalíticos solo sería válida con bajos tiempos de modificación.

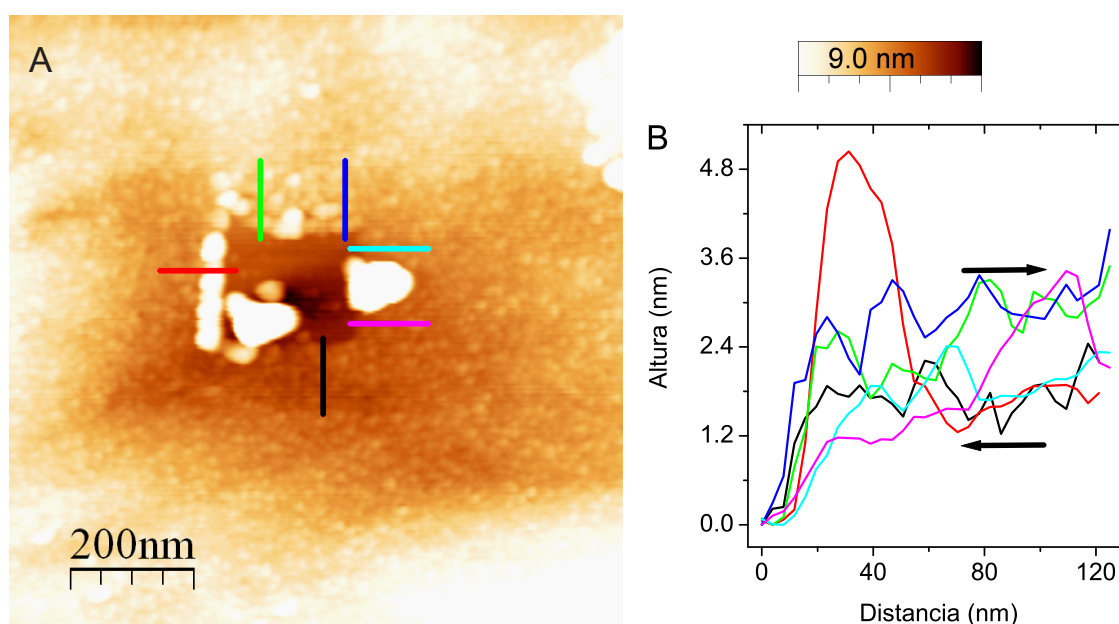


Figura 72. Imagen topográfica y perfiles tras la retirada de material de la superficie tras 4 horas de adsorción en disolución de 1.02 mM CB[7]. A: imagen topográfica; B: perfiles realizados en A representados con el mismo color.

Mientras que con CB[6] si se han descrito estructuras en forma de columna en estado sólido en ausencia de metales [38], en el mejor de nuestro conocimiento solo hay un ejemplo de interacciones de CB[7] consigo mismo en estado sólido y es la formación de hidrogeles. En este caso las fibras de los hidrogeles están compuestas por agrupaciones de moléculas de CB[7] ordenadas mediante una red de enlaces de hidrógeno, pero en las que estas no se encuentran con los planos de las entradas a la cavidad en paralelo en todos los casos [92]. Debido a esta formación de multicapas, para 24 h de adsorción a partir de disolución 0.1 mM (10 veces más diluida que en nuestro caso) se observaron partículas de altura de hasta 4 nm [86].

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1) El aumento de concentración de CB[6] concentración constante de Cd (II) trabajando con un electrodo de gota estática de mercurio condujo a la disminución de la señal del Cd (II) libre y a la aparición de nuevas señales en cada barrido, a potenciales más negativos en el catódico y menos negativos en el anódico, en los electrolitos ácido clorhídrico y ácido sulfúrico como en tampón amoniacal. Dichas ondas son debidas a que el CB[6] se adsorbe en la superficie del electrodo. La interacción entre el Cd (II) y el CB[6] no es debida a la formación de un complejo en disolución sino a que el Cd (II) al reducirse y el Cd(Hg) al oxidarse interaccionan con el CB[6] adsorbido.

2) El CB[6] mostró una mayor afinidad a interaccionar por el Zn (II) que por el Cd (II) debido al menor tamaño del Zn (II).

3) El CB[6] se adsorbía en la superficie del electrodo como especie catiónica, con una o ambas entradas a la cavidad uniendo cationes presentes en el electrolito.

4) La escala cualitativa de efecto competidor del protón y los iones de metales alcalinos fue cuanto mayor tamaño del catión, mayor fue la competencia en la interacción entre el Cd (II) y el CB[6].

5) El Cd (II) interaccionó con el CB[6] en electrolitos con presencia de cloruros donde la especie metálica predominante fue el $[\text{CdCl}_4]^{2-}$ por lo que la interacción se tuvo que dar previa liberación de los ligandos cloruro.

6) El ioxynil y el CB[6] no formaron un complejo de inclusión.

7) Las condiciones óptimas para la determinación de ioxynil en ausencia de CB[6] fueron en 0.5 M tampón fosfato pH 6.1 mediante voltamperometría diferencial de impulsos con tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, potencial inicial, incremento de potencial, velocidad de barrido y amplitud de 300 s, 10 s, 0.04 s, 0.5 s, -0.2 V, 9 mV, 18 mV/s y 79.95 mV, respectivamente.

8) La señal electroquímica de la reducción de ioxynil en ausencia de CB[6] fue lineal entre 2.35 y 22 ng/ml con una relación entre la intensidad de pico y la concentración de $I_p \text{ (A)} = 1.07 \cdot 10^{-9} C \text{ (ng/ml)} + 9.86 \cdot 10^{-10}$, $R^2=0.9990$. El límite de cuantificación de ioxynil en estas condiciones, determinado como 10 veces la desviación estándar, fue de 2.35 ng/ml y el error relativo y la desviación estándar relativa fueron inferiores al 7% (n=5).

9) Las condiciones óptimas para la determinación de ioxynil en presencia de CB[6] fueron a una concentración de de CB[6] de 0.1 mM en 0.05 M tampón ácido acético/acetato pH 4.3 mediante voltamperometría diferencial de impulsos con tiempo de deposición, tiempo de equilibrio, tiempo de impulso, tiempo entre impulsos, potencial inicial, incremento de potencial, velocidad de barrido y amplitud de, respectivamente, 300 s, 10 s, 0.04 s, 0.5 s, -0.1 V, 9 mV, 18 mV/s y 79.95 mV. La señal electroquímica de la reducción de ioxynil en presencia de CB[6] fue lineal entre 6.46 y 15.0 ng/ml con una relación entre la intensidad de pico y la concentración de $I_p (A) = 9.94 \cdot 10^{-10} C (ng/ml) + 1.44 \cdot 10^{-10}$, $R^2=0.9998$. El límite de cuantificación, determinado como 10 veces la desviación estándar, fue de 6.46 ng/ml y el error relativo y la desviación estándar relativa fueron inferiores al 10% (n=5).

10) La recuperación de ioxynil en presencia de CB[6] en agua potable dopada con ioxynil fue del 87% con un error relativo y una desviación estándar relativa inferiores al 12% (n=5).

11) La altura de la partícula de CB[6] adsorbida sobre oro medida mediante microscopía de fuerzas atómicas fue de 0.71 ± 0.16 nm.

12) La adsorción del CB[6] a partir de su disolución en 0.1 M sulfato sódico se vio ralentizada respecto al uso de su disolución saturada en agua porque hay menos entradas disponibles para que se diese la adsorción o porque previa a la adsorción se tuvo que dar la liberación del o los iones Na^+ unidos a la entrada a la cavidad por la que el CB[6] se unía a la superficie.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. Isaacs. *Chemical Communications*, 2009, 619-629.
- [2] K. Kim, N. Selvapalam, D.H. Oh. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2004, 50, 31-36.
- [3] K. Kim, N. Selvapalam, Y. H. Ko, K. M. Park, D. Kim, J. Kim. *Chemical Society Reviews*, 2007, 36, 267-279.
- [4] J. Lee, S. Samal, N. Selvapalam, H. Kim, K. Kim. *Accounts of Chemical Research*, 2003, 36, 621-630.
- [5] J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, L. Isaacs. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2005, 44, 4844-4870.
- [6] R. Behrend, E. Meyer, F. Rusche. *Justus Liebigs Annalen Der Chemie*, 1905, 339, 1-37.
- [7] J. Kim, I. Jung, S. Kim, E. Lee, J. Kang, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122, 540-541.
- [8] W. Freeman, W. Mock, N. Shih. *Journal of the American Chemical Society*, 1981, 103, 7367-7368.
- [9] A. Day, A. Arnold, R. Blanch, B. Snushall. *Journal of Organic Chemistry*, 2001, 66, 8094-8100.
- [10] R. J. Blanch, A. J. Sleeman, T. J. White, A. P. Arnold, A. I. Day. *Nano Letters*, 2002, 2, 147-149.
- [11] A. Day, R. Blanch, A. Arnold, S. Lorenzo, G. Lewis, I. Dance. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2002, 41, 275-277.
- [12] S. Liu, P. Zavalij, L. Isaacs. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127, 16798-16799.
- [13] A. Flinn, G. Hough, J. Stoddart, D. Williams. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 1992, 31, 1475-1477.
- [14] J. Zhao, H. Kim, J. Oh, S. Kim, J. Lee, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2001, 40, 4233-4235.
- [15] S. Jon, N. Selvapalam, D. Oh, J. Kang, S. Kim, Y. Jeon, J. Lee, K. Kim. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125, 10186-10187.

-
- [16] P. Germain, J. Letoffe, M. Merlin, H. Buschmann. *Thermochimica Acta*, 1998, 315, 87-92.
- [17] Y. Jeon, D. Whang, J. Kim, K. Kim. *Chemistry Letters*, 1996, 25, 503-504.
- [18] W. Mock, N. Shih. *Journal of Organic Chemistry*, 1986, 51, 4440-4446.
- [19] C. Marquez, R. Hudgins, W. Nau. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126, 5806-5816.
- [20] C. Marquez, W. Nau. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2001, 40, 3155-3160.
- [21] W. Jeon, K. Moon, S. Park, H. Chun, Y. Ko, J. Lee, E. Lee, S. Samal, N. Selvapalam, M. Rekharsky, V. Sindelar, D. Sobransingh, Y. Inoue, A. Kaifer, K. Kim. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127, 12984-12989.
- [22] J. Mohanty, A. Bhasikuttan, W. Nau, H. Pal. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110, 5132-5138.
- [23] Y. Kim, H. Kim, Y. H. Ko, N. Selvapalam, M. V. Rekharsky, Y. Inoue, K. Kim. *Chemistry-A European Journal*, 2009, 15, 6143-6151.
- [24] K. Kim. *Chemical Society Reviews*, 2002, 31, 96-107.
- [25] H. Buschmann, K. Jansen, C. Meschke, E. Schollmeyer. *Journal of Solution Chemistry*, 1998, 27, 135-140.
- [26] H. Buschmann, E. Cleve, K. Jansen, E. Schollmeyer. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 437, 157-163.
- [27] H. Buschmann, E. Cleve, K. Jansen, A. Wego, E. Schollmeyer. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 2001, 14, 35-39.
- [28] H.-J. Buschmann, E. Cleve, L. Mutihac, E. Schollmeyer. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2009, 65, 293-297.
- [29] K. Jansen, H. Buschmann, A. Wego, D. Dopp, C. Mayer, H. Drexler, H. Holdt, E. Schollmeyer. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2001, 39, 357-363.
- [30] H. Buschmann, E. Cleve, E. Schollmeyer. *Inorganica Chimica Acta*, 1992, 193, 93-97.

- [31] Y. Jeon, H. Kim, D. Whang, K. Kim. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118, 9790-9791.
- [32] H. Buschmann, E. Cleve, K. Jansen, A. Wego, E. Schollmeyer. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2001, 40, 117-120.
- [33] O. Gerasko, D. Samsonenko, V. Fedin. *Russian Chemical Reviews*, 2002, 71, 741-760.
- [34] X. Feng, Z.-F. Li, S.-F. Xue, Z. Tao, Q.-J. Zhu, Y.-Q. Zhang, J.-X. Liu. *Inorganic Chemistry*, 2010, 49, 7638-7640.
- [35] J. Heo, J. Kim, D. Whang, K. Kim. *Inorganica Chimica Acta*, 2000, 297, 307-312.
- [36] J. Heo, S. Kim, D. Whang, K. Kim. *Angewandte Chemie-International Edition*, 1999, 38, 641-643.
- [37] D. Whang, J. Heo, J. Park, K. Kim. *Angewandte Chemie-International Edition*, 1998, 37, 78-80.
- [38] D. Bardelang, K. A. Udachin, D. M. Leek, J. A. Ripmeester. *CrystEngComm*, 2007, 9, 973-975.
- [39] I. Osaka, M. Kondou, N. Selvapalam, S. Samal, K. Kim, M. Rekharsky, Y. Inoue, R. Arakawa. *Journal of Mass Spectrometry*, 2006, 41, 202-207.
- [40] M. V. Rekharsky, Y. H. Ko, N. Selvapalam, K. Kim, Y. Inoue. *Supramolecular Chemistry*, 2007, 19, 39-46.
- [41] K. B. Tarmyshov, F. Mueller-Plathe. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110, 14463-14468.
- [42] W. Ong, A. Kaifer. *Journal of Organic Chemistry*, 2004, 69, 1383-1385.
- [43] Y. J. Jeon, H. Kim, S. Jon, N. Selvapalam, D. H. Oh, I. Seo, C.-S. Park, S. R. Jung, D.-S. Koh, K. Kim. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126, 15944-15945.
- [44] X. Zhang, K. Krakowiak, G. Xue, J. Bradshaw, R. Izatt. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2000, 39, 3516-3520.
- [45] X. Feng, X.-J. Lu, S.-F. Xue, Y.-Q. Zhang, Z. Tao, Q.-J. Zhu. *Inorganic Chemistry Communications*, 2009, 12, 849-852.

- [46] S. Liu, C. Ruspic, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, P. Zavalij, L. Isaacs. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127, 15959-15967.
- [47] P. Mukhopadhyay, A. Wu, L. Isaacs. *Journal of Organic Chemistry*, 2004, 69, 6157-6164.
- [48] L. A. Baumes, M. Buaki, P. Montes-Navajas, A. Corma, H. García. *Sensor Letters*, 2010, 8, 698-708.
- [49] M. Rekharsky, H. Yamamura, M. Kawai, I. Osaka, R. Arakawa, A. Sato, Y. Ko, N. Selvapalam, K. Kim, Y. Inoue. *Organic Letters*, 2006, 8, 815-818.
- [50] S. Gadde, A. E. Kaifer. *Current Organic Chemistry*, 2011, 15, 27-38.
- [51] W. Ong, A. Kaifer. *Organometallics*, 2003, 22, 4181-4183.
- [52] L. Cui, S. Gadde, W. Li, A. E. Kaifer. *Langmuir*, 2009, 25, 13763-13769.
- [53] D. Sobransingh, A. E. Kaifer. *Organic Letters*, 2006, 8, 3247-3250.
- [54] M. V. Rekharsky, T. Mori, C. Yang, Y. H. Ko, N. Selvapalam, H. Kim, D. Sobransingh, A. E. Kaifer, S. Liu, L. Isaacs, W. Chen, S. Moghaddam, M. K. Gilson, K. Kim, Y. Inoue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104, 20737-20742.
- [55] J. F. Young, H. D. Nguyen, L. Yang, J. Huskens, P. Jonkheijm, L. Brunsveld. *ChemBioChem*, 2010, 11, 180-183.
- [56] I. Hwang, K. Baek, M. Jung, Y. Kim, K. M. Park, D.-W. Lee, N. Selvapalam, K. Kim. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129, 4170-4171.
- [57] D.-W. Lee, K. M. Park, M. Banerjee, S. H. Ha, T. Lee, K. Suh, S. Paul, H. Jung, J. Kim, N. Selvapalam, S. H. Ryu, K. Kim. *Nature Chemistry*, 2011, 3, 154-159.
- [58] D. Sobransingh, A. Kaifer. *Chemical Communications*, 2005, 5071-5073.
- [59] D. Sobransingh, A. E. Kaifer. *Langmuir*, 2006, 22, 10540-10544.
- [60] H. Kim, W. Jeon, Y. Ko, K. Kim. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99, 5007-5011.
- [61] W. Ong, M. Gomez-Kaifer, A. Kaifer. *Organic Letters*, 2002, 4, 1791-1794.
- [62] K. Moon, A. Kaifer. *Organic Letters*, 2004, 6, 185-188.
- [63] V. Sindelar, S. Silvi, A. E. Kaifer. *Chemical Communications*, 2006, 2185-2187.

- [64] J. Lee, K. Kim, K. Kim. *Chemical Communications*, 2001, 1042-1043.
- [65] W. Ong, A. Kaifer. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2003, 42, 2164-2167.
- [66] H. Kim, J. Heo, W. Jeon, E. Lee, J. Kim, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2001, 40, 1526-1529.
- [67] Y. H. Ko, E. Kim, I. Hwang, K. Kim. *Chemical Communications*, 2007, 1305-1315.
- [68] J. W. Lee, K. Kim, S. Choi, Y. H. Ko, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim. *Chemical Communications*, 2002, 2692-2693.
- [69] J. W. Lee, I. Hwang, W. S. Jeon, Y. H. Ko, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim. *Chemistry-An Asian Journal*, 2008, 3, 1277-1283.
- [70] M. Bush, N. Bouley, A. Urbach. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127, 14511-14517.
- [71] W. Jeon, H. Kim, C. Lee, K. Kim. *Chemical Communications*, 2002, 1828-1829.
- [72] W. Jeon, A. Ziganshina, J. Lee, Y. Ko, J. Kang, C. Lee, K. Kim. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2003, 42, 4097-4100.
- [73] K. Moon, J. Grindstaff, D. Sobransingh, A. Kaifer. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2004, 43, 5496-5499.
- [74] J.-K. Kang, I. Hwang, Y. H. Ko, W. S. Jeon, H.-J. Kim, K. Kim. *Supramolecular Chemistry*, 2008, 20, 149-155.
- [75] K. Kim, D. Kim, J. Lee, Y. Ko, K. Kim. *Chemical Communications*, 2004, 848-849.
- [76] K. M. Park, K. Suh, H. Jung, D.-W. Lee, Y. Ahn, J. Kim, K. Baek, K. Kim. *Chemical Communications*, 2009, 71-73.
- [77] A. Corma, H. García, P. Montes-Navajas, A. Primo, J. J. Calvino, S. Trasobares. *Chemistry-A European Journal*, 2007, 13, 6359-6364.
- [78] P. Montes-Navajas, H. García. *Journal of Physical Chemistry C*, 2010, 114, 18847-18852.
- [79] C. Kim, S. S. Agasti, Z. Zhu, L. Isaacs, V. M. Rotello. *Nature Chemistry*, 2010, 2, 962-966.
- [80] S. Angelos, Y.-W. Yang, K. Patel, J. F. Stoddart, J. I. Zink. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2008, 47, 2222-2226.

-
- [81] S. Angelos, Y.-W. Yang, N. M. Khashab, J. F. Stoddart, J. I. Zink. *Journal of the American Chemical Society* 2009, 131, 11344-11346
- [82] F. Tian, N. Cheng, N. Nouvel, J. Geng, O. A. Scherman. *Langmuir*, 2010, 26, 5323-5328.
- [83] K. Kim, W. Jeon, J. Kang, J. Lee, S. Jon, T. Kim, K. Kim. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2003, 42, 2293-2296.
- [84] G. Jean-Francois Demets, B. V. Skalee Schneider, H. Dias Correia, R. Rocha Goncalves, T. Morimoto Nobre, M. E. Darbello Zaniquelli. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2008, 8, 432-435.
- [85] Q. An, G. Li, C. Tao, Y. Li, Y. Wu, W. Zhang. *Chemical Communication*, 2008, 1989-1991.
- [86] A. Gomez-Casado, P. Jonkheijm, J. Huskens. *Langmuir*, 2011, 27, 11508-11513.
- [87] W. Mock, T. Irra, J. Wepsiec, T. Manimaran. *Journal of Organic Chemistry*, 1983, 48, 3619-3620.
- [88] L. S. Berbeci, W. Wang, A. E. Kaifer. *Organic Letters*, 2008, 10, 3721-3724.
- [89] S. Jon, Y. Ko, S. Park, H. Kim, K. Kim. *Chemical Communications*, 2001, 1938-1939.
- [90] H. Isobe, N. Tomita, J. Lee, H. Kim, K. Kim, E. Nakamura. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2000, 39, 4257-4260.
- [91] S. Lim, H. Kim, N. Selvapalam, K.-J. Kim, S. J. Cho, G. Seo, K. Kim. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2008, 47, 3352-3355.
- [92] I. Hwang, W. S. Jeon, H.-J. Kim, D. Kim, H. Kim, N. Selvapalam, N. Fujita, S. Shinkai, K. Kim. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007, 46, 210-213.
- [93] S. Gadde, E. K. Batchelor, J. P. Weiss, Y. Ling, A. E. Kaifer. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130, 17114-17119.
- [94] S. Gadde, E. K. Batchelor, A. E. Kaifer. *Chemistry-A European Journal*, 2009, 15, 6025-6031.
- [95] N. J. Wheate. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2008, 102, 2060-2066.
- [96] Q. An, Q. Chen, W. Zhu, Y. Li, C.-A. Tao, H. Yang, Z. Li, L. Wan, H. Tian, G. Li.

- Chemical Communications, 2010, 46, 725-727.
- [97] M. del Pozo, L. Hernández, C. Quintana. *Talanta*, 2010, 81, 1542-1546.
- [98] M. del Pozo, M. Alonso, L. Hernández, C. Quintana. *Electroanalysis*, 2011, 23, 189-195.
- [99] M. del Pozo, P. Hernández, L. Hernández, C. Quintana. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21, 13657-13663.
- [100] M. Malouki, A. Zertal, B. Lavedrine, T. Sehili, P. Boule. *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry*, 2004, 168, 15-22.
- [101] G. Freyssinet, B. Pelissier, M. Freyssinet, R. Delon. *Field Crops Research*, 1996, 45, 125-133.
- [102] M. S. Holtze, S. R. Sorensen, J. Sorensen, J. Aamand. *Environmental Pollution*, 2008, 154, 155-168.
- [103] Directiva 98/83/CE.
- [104] Z. Aturki, C. Desiderio, C. Polcaro. *Chromatographia*, 2001, 54, 489-494.
- [105] R. Rodríguez, J. Manes, Y. Pico. *Analytical Chemistry*, 2003, 75, 452-459.
- [106] A. Juan-García, G. Font, C. Juan, Y. Pico. *Food Chemistry*, 2010, 120, 1242-1249.
- [107] K. Nick, H. Scholer. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1992, 343, 304-307.
- [108] J. Nolte, B. Grass, F. Heimlich, D. Klockow. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1997, 357, 763-767.
- [109] C. Sánchez-Brunete, A. García Valcarcel, J. Tadeo. *Chromatographia*, 1994, 38, 624-628.
- [110] R. Flanagan, M. Ruprah. *Clinical Chemistry*, 1989, 35, 1342-1347.
- [111] J. Gabriel, J. Vekova, J. Vosahlo. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 1996, 681, 191-195.
- [112] T. Maswabi, M. Nindi. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 2003, 17, 119-128.
- [113] W. Buchberger, H. Malissa, K. Winsauer. *Mikrochimica Acta*, 1984, 1, 53-61.
- [114] C. Faller, A. Meyer, G. Henze. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1996, 356, 279-283.

- [115] E. Garrido, C. Delerue-Matos, J. Lima, A. Brett. *Analytical Letters*, 2004, 37, 1755-1791.
- [116] R. Sokolova, M. Hromadova, J. Ludvik, L. Pospisil, S. Giannarelli. *Electrochimica Acta*, 2010, 55, 8336-8340.
- [117] G. Binnig, H. Rohrer. *Helvetica Physica Acta*, 1982, 55, 726-735.
- [118] G. Binnig, C. Quate, C. Gerber. *Physical Review Letters*, 1986, 56, 930-933.
- [119] C. Quintana, C. S. H. Dominguez, E. Blanco, P. Hernandez, L. Hernandez. *Microchimica Acta*, 2010, 171, 41-47.
- [120] *Encyclopedia of Condensed Matter Physics. Scanning Probe Microscopy*. J. Gómez-Herrero, R. Reifemberger, Elsevier, 2005, 172-182.
- [121] *Polímeros de Coordinación en Superficie*. Tesis Doctoral, L. Welte, 2009, Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Inorgánica.
- [122] E. Blanco, C. S. H. Domínguez, P. Hernández, J. Vicente Hernández, C. Quintana, L. Hernández. *Electroanalysis*, 2009, 21, 495-500.
- [123] J. M. Domínguez-Vera, L. Welte, N. Galvez, B. Fernández, J. Gómez-Herrero, F. Zamora. *Nanotechnology*, 2008, 19, 025302
- [124] E. Blanco, C. Quintana, P. Hernández, L. Hernández. *Electroanalysis*, 2010, 22, 2123-2130.
- [125] *Química*. R. Chang, McGraw-Hill Interamericana de España, S.L., 2010.
- [126] I. Sick. *Physics Letters B*, 2003, 576, 62-67.
- [127] T. Sears, P. Bunker, P. Davies, S. Johnson, V. Spirko. *Journal of Chemical Physics*, 1985, 83, 2676-2685.
- [128] D. Marx, M. Tuckerman, J. Hutter, M. Parrinello. *Nature*, 1999, 397, 601-604.
- [129] *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*. A. J. Bard, John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [130] *Análisis Químico Cuantitativo*. D. C. Harris, Editorial Reverte S.A., 2001.
- [131] K. Novoselov, A. Geim, S. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. Dubonos, I. Grigorieva, A. Firsov. *Science*, 2004, 306, 666-669.
- [132] H. G. Hansma, D. E. Laney. *Biophysical Journal*, 1996, 70, 1933-1939.